

**UNTERSUCHUNG DER AMINOSÄURESEQUENZ
DES N-TERMINALEN PROKOLLAGEN-
PEPTIDES VON TYP I PROKOLLAGEN**

Hans Dietrich Hörlein

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549006_0025

UNTERSUCHUNG DER AMINOSÄURESEQUENZ
DES N-TERMINALEN PROKOLLAGENPEPTIDES
VON TYP I PROKOLLAGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Hans Dietrich Hörlein aus Wuppertal

München 1977



1. Berichterstatter : Prof.Dr. Linzen

2. Berichterstatter : Prof.Dr. Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung : 15.2.1978

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck Institut für Biochemie in Martinsried in der Zeit von Mai 1974 bis Januar 1977 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Klaus Kühn und Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen danke ich für die wohlwollende Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Peter Fietzek danke ich ganz besonders für die hervorragende Betreuung der Arbeit und viele anregende Diskussionen.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises und insbesondere Frau Veronique Heinemann danke ich für Ratschläge und ständige Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Charles M.Lapière, Universität Liège, Belgien, danke ich für die Überlassung der dermatosparaxischen Kalbshäute.

Herrn Dr. E. Wachter danke ich für die Sequenzanalysen im "solid-phase"-Sequenator.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGEN	
EINLEITUNG	1
AUFGABENSTELLUNG	15
NOMENKLATUR	16
EXPERIMENTELLER TEIL	18
ERGEBNISSE	28
1. Isolierung der Prokollagenpeptide nach Kollagenase- und Bromcyanspaltung von harnstoffunlöslichem Prokollagen	28
1.1. Isolierung des kollagenaseresistenten Teils (pal(I)-CB O,1-CL1) aus dem Prokollagenpeptidbereich	28
1.2. Analytische Voruntersuchung zur Bromcyanspaltung von pal(I)-Ketten	31
1.3. Isolierung von pal(I)-CB O,1 nach Bromcyanabbau von harnstoffunlöslichem Prokollagen	36
1.4. Zusammenfassung	39
2. Fragmentierung von pal(I)-CB O,1 und pal(I)-CB O,1-CL1	41
2.1. Spaltung von pal(I)-CB O,1-CL1 mit Clostripain	41

	Seite
2.2. Spaltung von pal(I)-CB 0,1-CL1 und pal(I)-CB 0,1 mit Trypsin	45
2.3. Nachspaltungen von pal(I)-CB 0,1-T1	53
2.4. Spaltung von pal(I)-CB 0,1 und pal(I)-CB 0,1-CL1 mit der Staphylokokken-Protease	58
2.5. Zusammenfassung	68
3. Sequenzierung des Prokollagenpeptids	69
3.1. Allgemeines zur Sequenzierungstechnik	69
3.2. Ergebnisse der Sequenzierung der einzelnen Fragmente des Prokollagenpeptids	72
DISKUSSION	81
ZUSAMMENFASSUNG	92
LITERATURANGABEN	94

ABKÜRZUNGEN

SDS	Natrium-dodecylsulfat
OD	optische Dichte
ATZ-	Anilinothiazolinon-
PTH-	Phenylthiohydantoin-
Quadrol	N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)-äthyldiamin
DMAA	Dimethyl-allylamin
DTE	Dithioerythrit
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
BrCN	Bromcyan
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanyl-Chloromethyl-Keton
CM-	Carboxymethyl-
PC	Phosphocellulose
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
HLK	harnstofflösliches Kollagen
ULK	unlöslicher Kollagenrückstand nach Harnstoff- extraktion
AEC	Aminoäthylcystein
pGlu	Pyroglutaminsäure

EINLEITUNG

Bindegewebe wird in sehr verschiedenen Formen weit verbreitet im tierischen Organismus gefunden. Trotz dieser Vielfalt beobachtet man immer ein ähnliches Prinzip des Aufbaues aus relativ wenigen Zellen und einer großen Menge an extrazellulärer Matrix, die hauptsächlich aus Kollagen, Elastin und Proteoglykanen besteht. Die verschiedenen Formen des Bindegewebes sind durch die relativen Anteile der Zellen, Faserproteine und Proteoglykane sowie durch die makromolekulare Organisation der Kollagenfibrillen charakterisiert.

Grundbaustein der Kollagenfibrillen ist das Kollagenmolekül, das mit einer Länge von $2900 \text{ \AA}$ und einem Durchmesser von nur $14 \text{ \AA}$ stäbchenförmige Gestalt hat. Es besteht aus drei Ketten - den α -Ketten - mit je etwa 1050 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 290.000 (1). Die einzelnen α -Ketten liegen in einer linksgängigen Helix vor und sind um eine gemeinsame Achse zu einer rechtsgängigen Superhelix - der Kollagentripelhelix - verdreht. Strukturelle Voraussetzung für die Ausbildung dieser Helix ist einerseits ein hoher Gehalt an den Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin - sie machen zusammen etwa 25% der Aminosäuren im Kollagen aus - und andererseits das Auftreten eines Glycinrestes in jeder dritten Position der Aminosäuresequenz (2,3). Dadurch besteht die

α -Kette bis auf kleine Bereiche am N- und C-Terminus aus Tripeptideinheiten der allgemeinen Formel (Gly-X-Y), wobei die Tripeptide (Gly-Pro-Y) und (Gly-Pro-Hyp) eine besondere Bedeutung für die Stabilität der tripelhelikalen Struktur haben (4). Gefestigt wird das Molekül außerdem durch Ausbildung einer großen Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen, an denen die Peptidbindungen, Hydroxyprolin und Wassermoleküle beteiligt sind (5).

Ein weiteres wichtiges Strukturmerkmal des Moleküls ist die Verteilung der polaren, geladenen Aminosäuren entlang der Peptidkette. Die Reste sind nicht gleichmäßig entlang der Peptidkette verteilt, sondern werden in bestimmten Bereichen stark gehäuft gefunden (6,7). Diese charakteristische Anordnung gibt dem Molekül ein spezifisches Ladungsmuster, mit dem die Zusammenlagerung der Moleküle zu Fibrillen gesteuert wird. In der Fibrille liegen die Einzelmoleküle annähernd viertelversetzt zusammen, wodurch ein Maximum an elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen erzielt wird (6).

An beiden Enden der α -Ketten befinden sich kurze, nicht tripelhelikale Bereiche. Sie enthalten jeweils einen Lysin- oder Hydroxylysinrest, der durch oxidative Desaminierung in den entsprechenden Aldehyd umgewandelt wird und dann mit Lysin- oder Hydroxylysinresten benachbarter Moleküle kovalente Quervernetzungen eingeht (Schiff'sche

Basen), die dem Fibrillenverband seine hohe mechanische Stabilität geben (7).

Bis heute sind vier verschiedene, genetisch distinkte Kollagentypen beschrieben. Typ I Kollagen - hauptsächlich in Haut, Sehnen und Knochen verbreitet - ist im Gegensatz zu den anderen drei Kollagenen aus zwei verschiedenen Ketten aufgebaut. Das Molekül besteht aus zwei $\alpha 1(I)$ - und einer $\alpha 2$ -Kette. Die Moleküle der anderen Typen bestehen aus je drei identischen Ketten (8,9,10). Die α -Ketten der verschiedenen Kollagene unterscheiden sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung zwar erheblich, weisen aber - soweit die Sequenz bekannt ist - erhebliche Sequenzhomologien untereinander auf (7,11). In Abbildung 1 sind einige wesentliche Charakteristika der Kollagentypen dargestellt.

Besonders gut untersucht sind Typ I und das häufig mit ihm vergesellschaftete Typ III Kollagen (7,12,13). Von Typ I ist nahezu die vollständige Sequenz der $\alpha 1(I)$ - und der $\alpha 2$ -Kette für mehrere Spezies aufgeklärt (6); die Sequenz der $\alpha 1(III)$ -Kette ist zu etwa 50% bekannt (14,15,16). Von Knorpelkollagen, das als Typ II bezeichnet wird, sind die N- und C-terminalen Bereiche sequenziert worden, während von Typ IV, dem kollagenen Anteil der Basalmembranen, bisher keine Primärstrukturuntersuchungen vorliegen. Nach neuesten Erkenntnissen scheint Typ IV auch kein einheitliches Kollagen darzustellen, sondern vielmehr aus einer Reihe ähnlicher Typen zu bestehen (10,17,18).

Kollagen typ	Vorkommen	Molekül- aufbau	Hyp*	Hyl*	Hyp/Pro**	Hyl/Lys**	Zucker***
I	Haut, Sehnen, Knochen	$\alpha 1(I)_2 \alpha 2$	83	7	0,6	0,23	0,5
II	Knorpel	$\alpha 1(II)_3$	93	23	0,7	1,5	10
III	fötale Gewebe Haut, Gefäße, Retikulum	$\alpha 1(III)_3$	127	5	1,2	0,17	0,5
IV	Basalmembran	$\alpha 1(IV)_3$	141	45	2,1	4,5	12

* : Hyp (Hydroxyprolin) und Hyl (Hydroxylysin) in Reste/1000 Reste

** : Hyp/Pro und Hyl/Lys-Verhältnis aus Reste/1000 Reste durch Division erhalten

*** : Gehalt an Zucker (Galaktose und Glukose) in Gewichts-%

Abbildung 1: Kollagenpolymorphismus - charakteristische Eigenschaften der bisher beschriebenen Kollagentypen

Über die Beziehungen zwischen typenspezifischen, strukturellen Merkmalen der Kollagene und ihren physiologischen Funktionen ist bisher nur wenig bekannt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik ist es aber möglich geworden, genauere Aussagen über die Verteilung der Kollagentypen im Gewebe zu machen (19,20). Im Zusammenhang mit den biochemischen Untersuchungen können aus solchen Experimenten Hypothesen über die Funktion der einzelnen Kollagene abgeleitet werden.

Wie viele Proteine, die ihre physiologische Funktion außerhalb der Zelle erfüllen, wird auch Kollagen in einer Vorstufe - dem Prokollagen - synthetisiert (21,22,23). Die α -Ketten des Prokollagens (pro α -Ketten) enthalten zusätzliche Peptide am N- und C-Terminus, die nicht die typische tripelhelikale Konfiguration haben, sondern globulär sind. Das N-terminale Segment des Typ I Prokollagens hat ein Molekulargewicht von etwa 15.000 (24), das C-terminale von 35 - 40.000 (25,26). Damit erreicht die pro α -Kette insgesamt ein Molekulargewicht von etwa 150.000. Biosynthetische Vorstufen sind von allen vier Kollagentypen bekannt und teilweise schon charakterisiert worden (23).

Über die Biosynthese des Kollagens ist hinsichtlich der Transkription und Translation bisher wenig bekannt. Man nimmt an, daß sie genauso abläuft wie bei anderen Proteinen auch. Genaue Untersuchungen liegen dagegen über eine Reihe

von postribosomalen Veränderungen, denen das Kollagen unterliegt ehe das Molekül seine physiologisch aktive Form erhält, vor. Die Vorgänge verlaufen im Prinzip für alle Kollagentypen gleich (23,27).

Zuerst läuft ein komplexer Prozeß ab, der aus mehreren gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander ablaufenden Schritten besteht. Die pro α -Ketten werden an den Ribosomen des "rough endoplasmatic reticulum" (ER) synthetisiert und wandern durch die Membran in das Innere des ER. Hier werden bestimmte Prolin- und Lysinreste durch spezifische Enzyme (Prolyl- und Lysylhydroxylase) hydroxyliert. Die Bildung des Hydroxyprolins führt zu einer Stabilisierung der tripelhelikalen Konformation. Untersuchungen von unterhydroxyliertem Kollagen haben gezeigt, daß dieses eine wesentliche niedrigere Denaturierungstemperatur hat als normal hydroxyliertes Kollagen (23,28,31). Die Bildung des Hydroxylysins hat Bedeutung für zwei weitere Modifikationsschritte. Einmal ist Hydroxylysin an der Ausbildung der Quervernetzungen - also an der Stabilisierung des Fibrillenverbandes - beteiligt und zum anderen werden bestimmte Reste mit Galaktose oder Galaktosylglukose besetzt. Über die Bedeutung der Zucker am Kollagen ist bisher nichts bekannt. Man weiß nur, daß der Glykosilierungsgrad der einzelnen Kollagentypen sehr unterschiedlich ist (Abb. 1,32).

Nach Fertigstellung der pro α -Ketten lagern sich in einem noch weitgehend unverstandenen Prozeß je drei Ketten zusammen und bilden ein tripelhelikales Molekül. Dabei spielt

ein sehr spezifischer Auswahlmechanismus eine wichtige Rolle, weil viele Zellen mehrere Kollagentypen gleichzeitig nebeneinander synthetisieren können (29) und außerdem im Fall von Typ I eine Auswahl von zwei $\alpha 1(I)$ - und einer $\alpha 2$ -Kette erfolgen muß. Es gibt erste Hinweise, daß auch der Kettenauswahlprozeß enzymatisch gesteuert sein könnte. So konnte kürzlich gezeigt werden, daß unter dem Einfluß des Chelatbildners $\alpha\alpha'$ -Dipyridyl die Kettenauswahl für Typ I gestört werden kann (30). Es wurden Moleküle aus drei $\alpha 1(I)$ - und solche aus drei $\alpha 2$ -Ketten gefunden.

Streng koordiniert mit der Ausbildung der Tripelhelix werden zwischen den einzelnen pro α -Ketten Disulfidbrücken ausgebildet. Die zeitliche Verknüpfung der Helixbildung und der Disulfidquervernetzung läßt vermuten, daß die Vernetzung in irgendeiner Weise für die Bildung der Helix wesentlich ist (28).

Der Weg der Moleküle vom Ort der Synthese zum Ort ihrer physiologischen Funktion verläuft wahrscheinlich durch das endoplasmatische Retikulum zum Golgi-Apparat und von dort in Sekretionsvesikeln in den Extrazellularraum. Experimentelle Beweise für diesen Weg gibt es aber noch sehr wenige.

Eine zusammenfassende Darstellung aller postribosomalen Modifikationen des Kollagens ist in Abbildung 2 gegeben.

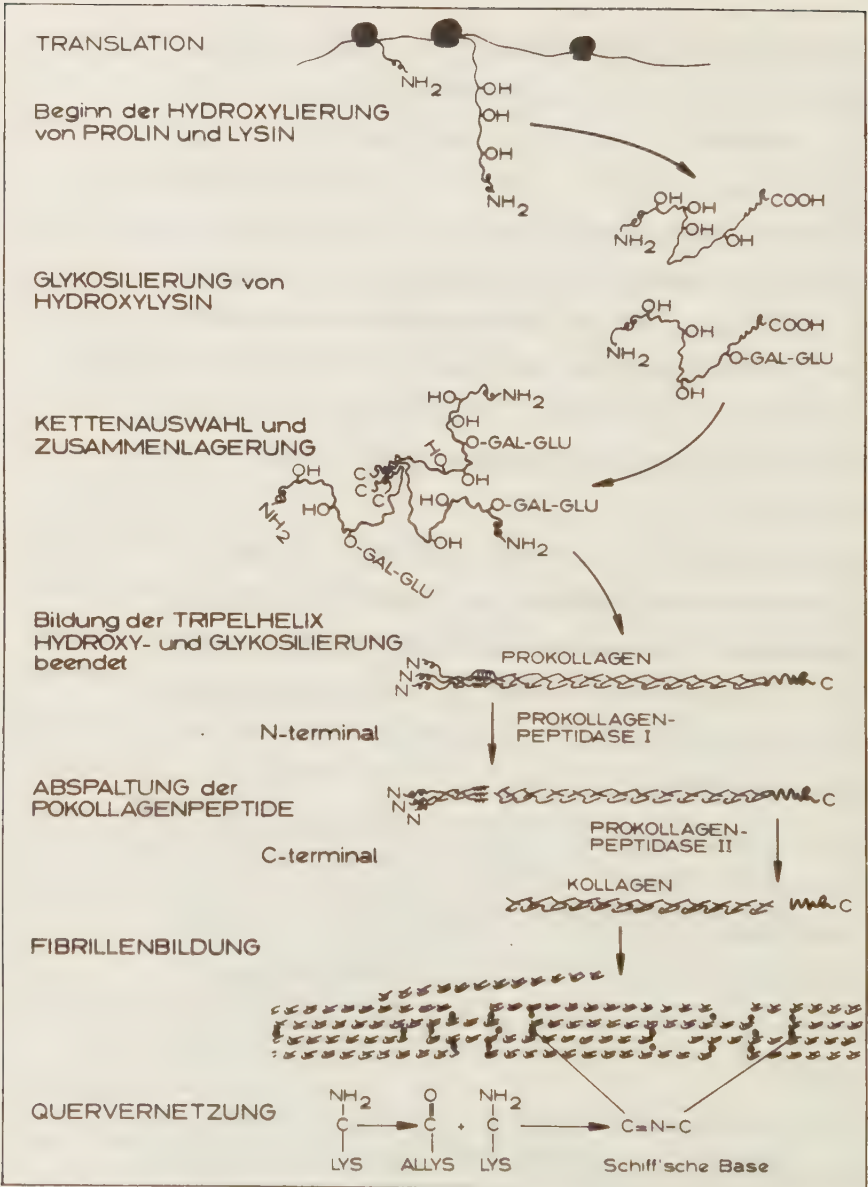


Abbildung 2: Schematische Darstellung der postribosomalen Modifikation des Kollagens

Die Umwandlung des Prokollagens in seine biologisch aktive Form - die Kollagenfibrille - stellt wiederum einen Komplex aus mehreren Einzelschritten dar. Diese werden teilweise enzymatisch und teilweise nichtenzymatisch gesteuert. Zunächst wird durch Abspaltung der N- und C-terminalen Prokollagenpeptide das Prokollagen in Kollagen umgewandelt (33,34,35). Dieser Prozeß wird von mindestens zwei verschiedenen Enzymen - den Prokollagenpeptidasen - durchgeführt (35). So konnte kürzlich gezeigt werden, daß unter Einwirkung von $\alpha\alpha'$ -Dipyridyl die Abspaltung des C-terminalen Propeptides von Typ I Kollagen blockiert werden kann, während die Abspaltung des N-terminalen Peptides normal verläuft (30). Umgekehrt sind Bindegewbserkrankungen beschrieben, bei denen die Umwandlung aminoterminal blockiert ist, während sie carboxyterminal normal verläuft (24,37,38). Außerdem gibt es Hinweise, daß das N-terminale Propeptid in einem (38), das C-terminale dagegen in zwei Schritten entfernt wird (30).

Die Zusammenlagerung der Moleküle zu Fibrillen erfolgt als nicht-enzymatischer "self-assembly"-Prozeß. Die Stabilisierung dieser Strukturen geschieht durch die Ausbildung von intermolekularen Quervernetzungen. Über das Verbleiben der Prokollagenpeptide ist bisher wenig bekannt. Es konnte nur gezeigt werden, daß das N-terminale Peptid sehr protease-stabil ist; es konnte als Ganzes in Amnionflüssigkeit und im Serum nachgewiesen werden (39). Über den Verbleib des C-terminalen Peptides ist bisher nichts bekannt.

Die Erkenntnisse, die zu den heutigen Vorstellungen über die postribosomalen Veränderungen des Kollagens geführt haben, wurden größtenteils durch Untersuchungen an Zell- und Organkulturen gewonnen. Von besonderer Bedeutung waren und sind dabei erstens die Möglichkeit, bestimmte Enzyme durch exogene Faktoren (zum Beispiel $\alpha\alpha'$ -Dipyridyl) zu hemmen und dann die Folgen für die Synthese zu untersuchen (23), und zweitens die Möglichkeit der Untersuchung von erblichen Bindegewebserkrankungen, in denen bestimmte Enzyme oder Regulationsmechanismen der Kollagenbiosynthese ausfallen (40,41). In Abbildung 3 sind einige solcher Erkrankungen mit den zugehörigen Störfaktoren genannt.

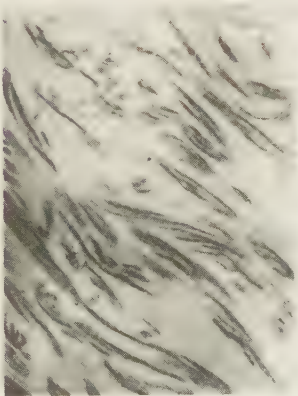
Erkrankung	betroffene Enzyme oder Faktoren
Ehlers-Danlos Syndrom Typ VI	Lysylhydroxylase
Ehlers-Danlos Syndrom Typ V	Lysyloxidase
Ehlers-Danlos Syndrom Typ VII Dermatosparaxie	Prokollagenpeptidase
Ehlers-Danlos Syndrom Typ IV	Typ I/Typ III-Verhältnis in Haut

Abbildung 3: Beispiele für Kollagenkrankheiten, die für die Untersuchungen zu den postribosomalen Veränderungen des Kollagens von Bedeutung sind.

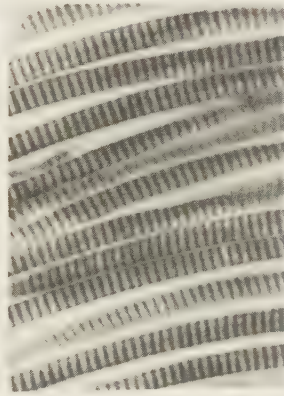
Für die Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Prokollagenpeptide ist eine Erkrankung, die bei Kälbern und Schafen beschrieben wurde, besonders gut geeignet (40,41). Diese Erkrankung - sie wird als Dermatosparaxie bezeichnet - zeichnet sich durch den Ausfall der Prokollagenpeptidase aus, die das N-terminale Propeptid abspaltet. Das C-terminale Peptid wird normal entfernt.

FIBRILLENBILDUNG

DERMATOSPARAXISCHE



NORMALE KALBSHAUT



VERGRÖßERUNG 40000-fach

ANFÄRBUNG:

PHOSPHORWOLFRAMSÄURE
URANYLACETAT

Abbildung 4 : Fibrillenbildung in dermosparaxischer und in normaler Kalbshaut zum Vergleich

Ein ähnlicher Defekt liegt auch einer erblichen Bindegewebserkrankung beim Menschen zu Grunde, die als Ehlers-

Danlos Syndrom Typ VII bekannt wurde (38). Als Folge des Enzymausfalls wird ein intermediäres Produkt angereichert, das keine physiologisch funktionsfähigen Fibrillen bilden kann, was vermutlich auf eine sterische Behinderung durch das aminoterminal Propeptid zurückzuführen ist. Elektronenoptisch stellt sich das dermatosparaxische Kollagen in sehr dünnen, verdrehten Filamenten dar (43,44,45). Abbildung 4 zeigt Fibrillen aus dermatosparaxischer und aus normaler Haut.

Die Fibrillen aus der erkrankten Haut lassen kaum eine geordnete makromolekulare Struktur erkennen. Infolgedessen ist die Haut der Tiere extrem leicht zerreißbar.

Die Entdeckung der Dermatosparaxie lieferte erstmals die Möglichkeit, strukturelle Untersuchungen an dem N-terminalen Propeptid durchzuführen. Unter normalen Umständen ist die Isolierung von Prokollagen aus Geweben oder Zellbeziehungsweise Organkulturen nur in sehr begrenztem Umfang möglich, weil es sich um ein sehr kurzlebiges Zwischenprodukt handelt. Aus der Haut dermatosparaxischer Kälber dagegen lassen sich unter geeigneten Bedingungen größere Mengen der Prokollagenpeptide isolieren (46,47). Die biochemische Charakterisierung von Typ I Prokollagen aus dermatosparaxischer Haut zeigte, daß es aus $\alpha 1(I)$ - (MG 110.000) und $\alpha 2$ -Ketten (MG 105.000) besteht. Weiter ergab sich, daß das Propeptid der $\alpha 1(I)$ -Kette etwa 140 Aminosäuren lang ist und nicht-kollagenen Charakter haben

sollte. Für die Reindarstellung des Peptides boten sich auf Grund dieser Untersuchungen prinzipiell zwei Methoden an, einmal die Bromcyanspaltung, weil es kein Methionin enthält und zum anderen die Spaltung mit bakterieller Kollagenase unter der Annahme, daß das Peptid keine kollagentypischen Sequenzen aufweist. Das N-terminale Bromcyan- und das N-terminale Kollagenasepeptid der $\alpha 1(I)$ -Kette - $\alpha 1(I)$ -CB O,1 und $\alpha 1(I)$ -CL 1 - sind identisch und bestehen aus 19 Aminosäureresten (48).

Nach beiden Methoden sollte also ein Peptid entstehen, daß das Propeptid enthält und zusätzlich die ersten 19 Reste der $\alpha 1(I)$ -Kette.

Aus Bromcyanspaltungen ließ sich zunächst das Propeptid nur in sehr schlechten Ausbeuten isolieren. Die Spaltung mit Kollagenase dagegen lieferte zwei Peptide aus dem Propeptidbereich - $\alpha 1(I)$ -CL 1 mit 98 und $\alpha 1(I)$ -CL 2 mit 30 Resten. Beide Peptide zusammen repräsentieren etwa 75% des gesamten Propeptides. $\alpha 1(I)$ -CL 1 stellt den aminoterminalen Bereich dar, während $\alpha 1(I)$ -CL 2 die C-terminalen 11 Aminosäuren des Propeptides und außerdem die oben erwähnten ersten 19 Reste der $\alpha 1(I)$ -Kette enthält. Die Tatsache, daß die Kollagenase im Propeptid spalten kann, deutet auf das Vorhandensein von tripelhelikalen Sequenzen hin. Abbildung 5 zeigt noch einmal die Zuordnung der beiden Kollagenasepeptide in der $\alpha 1(I)$ -Kette im Vergleich zu der $\alpha 1(I)$ -Kette.

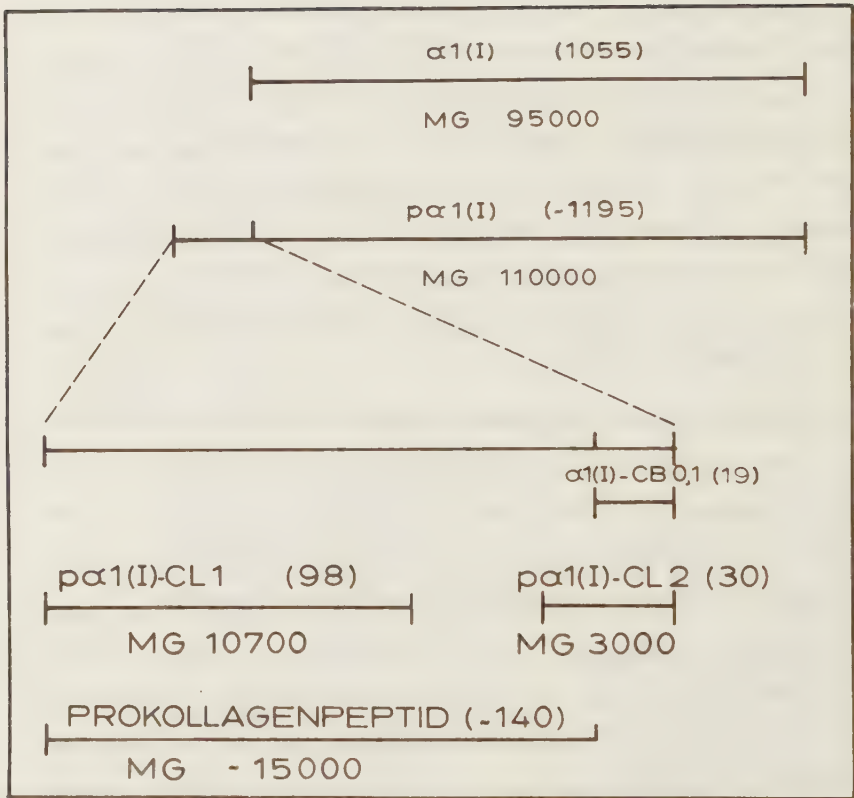


Abbildung 5: Zuordnung der beiden Kollagenasepeptide $p\alpha 1(I)-CL\ 1$ und $p\alpha 1(I)-CL\ 2$ mit Angabe der Aminosäurezahlen und Molekulargewichte.

Die Ausarbeitung der Methoden zur Isolierung von $p\alpha 1(I)-CL\ 1$ und $p\alpha 1(I)-CL\ 2$ stellten eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung der Primärstruktur des Prokollagenpeptides dar, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

AUFGABENSTELLUNG

Für die Prokollagenpeptide werden heute hauptsächlich drei Funktionen diskutiert. Erstens sollen sie am Prozeß der Kettenauswahl und an der Registrierung von je drei pro α -Ketten als Voraussetzung für die Ausbildung des intakten tripelhelikalen Moleküls beteiligt sein. Zweitens sollen sie eine wesentliche Rolle beim Transport des Moleküls durch die Zelle spielen, indem sie eine intrazelluläre Fibrillenbildung verhindern und drittens ist eine Regulation sowohl der Fibrillenbildung als auch der Kollagenbiosynthese überhaupt denkbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diesen Hypothesen durch die Untersuchung der Primärstruktur des N-terminalen Prokollagenpeptides der $\alpha 1(I)$ -Kette eine experimentelle Basis zu geben.

Im einzelnen sollten dazu folgende Untersuchungen gemacht werden:

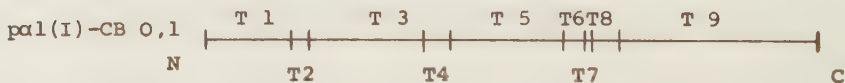
1. Isolierung und Charakterisierung des vollständigen N-terminalen Propeptides der $\alpha 1(I)$ -Kette.
2. Fragmentierung des Peptides mit enzymatischen Methoden; Isolierung, Charakterisierung und Zuordnung der entstehenden Bruchstücke.
3. Sequenzanalyse des Peptides mit Hilfe der isolierten Peptide unter Verwendung automatischer Sequenzierungsmethoden.

NOMENKLATUR

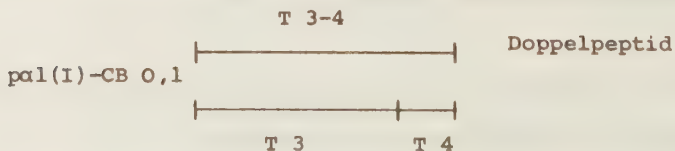
1. Für die aus den verschiedenen Spaltungen entstehenden Peptide wurden folgende Bezeichnungen benutzt:

Spaltung	Abkürzung	Beispiel
Bromcyan	CB	pal(I)-CB 0,1
Kollagenase	CL	pal(I)-CB 0,1-CL 1
Trypsin	T	pal(I)-CB 0,1-T 5
Clostripain	CP	pal(I)-CB 0,1-CP 3
Staphylokokken-Protease	SP	pal(I)-CB 0,1-SP 5
Thermolysin	Th	pal(I)-CB 0,1-SP 1-Th 2

2. Die Nummerierung der Peptide erfolgte immer fortlaufend vom N- zum C-Terminus:

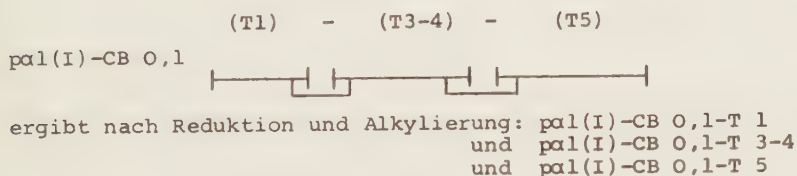


3. Doppelpeptide, die durch unvollständige Spaltung entstanden, wurden mit den Nummern bezeichnet, die die einzelnen Bruchstücke bei vollständiger Spaltung bekommen hätten:

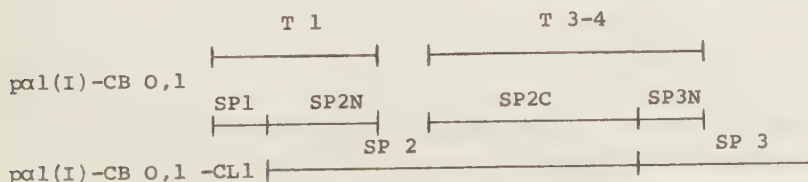


Die nicht gespaltene Bindung wird durch einen Bindestrich symbolisiert.

4. Bei Spaltung von disulfidquervernetztem Ausgangsmaterial (z.B. pal(I)-CB O,1-CL 1 unreduziert) entstanden auch Peptide, die zwar Spaltstellen aufwiesen, bei denen die einzelnen Fragmente aber noch durch Disulfidbrücken zusammengehalten wurden. Solche Peptide wurden mit den Bezeichnungen der nach Reduktion und Alkylierung entstehenden Fragmente versehen. Zur Unterscheidung von den in 3. genannten Doppelpeptiden wurden die einzelnen Bruchstücke in Klammern gesetzt.



5. Bei Nachspaltung von tryptischen Peptiden mit der Stappylkokken Protease wurde für die entstehenden Peptide von der Nomenklatur der Peptide aus der SP-Spaltung von pal(I)-CB O,1-CL 1 ausgegangen. Die Spaltung von T 1 ergibt zum Beispiel zwei Peptide, SP 1 und den N-terminalen Teil von SP 2, der dann als SP 2N bezeichnet wurde; ebenso ergibt die Spaltung von T 3-4 den C-terminalen Teil von SP 2 - SP 2C - und den N-terminalen Teil von SP 3 - SP 3N.



EXPERIMENTELLER TEIL

1. Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial wurden Häute dermatosparaxischer Kälber verwendet. Sie wurden gewaschen, rasiert, von Blut- und Fleischresten befreit und in Portionen zu je 600 g tiefgefroren.

2. Harnstoffextraktion und Isolierung von pol(I)-Ketten

Je 600 g Haut wurden zweimal mit 8M Harnstofflösung je 20 Stunden bei Raumtemperatur extrahiert, abzentrifugiert (60 Min. bei 15.000 x g) und die Überstände gegen den CM-Cellulose-Auftragspuffer (siehe 3.1.a.) dialysiert, nochmals abzentrifugiert und an CM-Cellulose aufgetrennt. Die pol(I)-Fraktion wurde an Agerose Al,5 (siehe 3.2.a.) rechromatographiert, entsalzt und gefriergetrocknet. Sie diente als Ausgangsmaterial für die Bromcyanspaltung.

3. Chromatographische Verfahren

Die verwendete chromatographische Trenneinheit bestand aus einer Säule, einem Spektralphotometer (Beckman DB) mit Schreiber und einem Fraktionssammler (LKB Ultro-Rac). Der Proteingehalt der Säuleneeluete wurde bei Wellenlängen zwischen 220nm und 245nm - gelegentlich auch bei 280nm - kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet.

3.1. Ionenaustauscher-Chromatographie

3.1.a. Carboxymethyl-Cellulose (CM-Cellulose)

Whatman CM-52, microgranular, preswollen

Die Trennung an CM-Cellulose erfolgte in auf 40°C thermostatisierten Säulen. Die Füllhöhe betrug 20 cm bei einem

Durchmesser von 2,5 cm. Der Durchfluß betrug 200 ml pro Stunde. Äquibriert waren die Säulen mit einem 0,02M Kaliumacetatpuffer mit pH 4,8, der 1M Harnstoff enthält. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,12M Lithiumchlorid über ein Gesamtvolumen von 2000 ml.

Startpuffer:	1,97 g	Kaliumacetat	
	0,76 ml	Eisessig	
	60 g	Harnstoff	ad 1000 ml
Limitpuffer:	wie Startpuffer		
	+ 5,08 g	Lithiumchlorid	ad 1000 ml

3.1.1.b. Phosphocellulose (PC)

Whatman P-11, fibrous powder form

Trennung ohne Zusatz von Harnstoff

Die Chromatographie erfolgte in auf 40°C thermostatisierten Säulen. Die Füllhöhe betrug je nach Trennproblem 10 oder 20 cm bei einem Durchmesser von 2,5 cm. Der Durchfluß betrug dementsprechend 100 oder 200 ml pro Stunde. Äquibriert waren die Säulen mit einem 1mM Natriumacetatpuffer mit pH 3,6. Eluiert wurde mit linearen Gradienten von 0 - 0,4M (gelegentlich auch 0 - 1M) über ein Gesamtvolumen von 800 ml (oder 3000 ml).

Pufferstammlösung:	13,6 g	Natriumacetat x 3H ₂ O	
	57,2 ml	Eisessig	ad 1000 ml
Startpuffer	: 10 ml	Stammlösung	ad 1000 ml
Limitpuffer	: wie Startpuffer		
	+ 0,4M (oder 1M) NaCl		

Trennung unter Zusatz von Harnstoff

Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur in einer Säule mit der Füllhöhe 20 cm und dem Durchmesser 2,5 cm. Der Durchfluß betrug 50 ml pro Stunde. Äquibriert war sie mit einem 1 mM Natriumacetatpuffer pH 3,6 mit 6M Harnstoff. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,2M Natriumchlorid über

ein Gesamtvolumen von 800 ml.

Pufferstammlösung:	13,6 g Natriumacetat x $3H_2O$	
	57,2 ml Eisessig	
	360 g Harnstoff	ad 1000 ml
Startpuffer	: 10 ml Stammlösung	ad 1000 ml
Limitpuffer	: wie Startpuffer	
	+ 0,2M (= 11,7 g) NaCl	ad 1000 ml

3.1.c. Diäthylaminoäthyl-Cellulose (DEAE-Cellulose)

Whatman DE-52, microgranular, preswollen

Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur in Säulen mit der Füllhöhe 20 cm und dem Durchmesser 2,5 cm oder der Füllhöhe 35 cm und dem Durchmesser 5 cm. Der Durchfluß betrug entsprechend 200 oder 500 ml pro Stunde. Äquilibriert waren die Säulen mit einem 0,05M Tris-HCl-Puffer mit pH 8,6, der 2M Harnstoff enthält. Eluiert wurde mit linearen Gradienten von 0 - 0,4M Natriumchlorid über ein Gesamtvolumen von 800 oder 5000 ml.

Startpuffer:	100 ml 0,5M Tris-HCl pH 8,6	
	120 g Harnstoff	ad 1000 ml
Limitpuffer:	wie Startpuffer	
	+ 0,4M NaCl	

3.2. Molekularsiebchromatographie

3.2.a. Bio-Gel Al,5(200-400mesh)

Sphärisches Agarose-Gel, 8%ig, Bio-Rad Laboratories

Die Chromatographie wurde in Säulen mit den Abmessungen 3,5 x 150 oder 5 x 150 cm durchgeführt. Eluiert wurde bei Raumtemperatur in 1M $CaCl_2$ /50mM Tris HCl pH 7,5. Der Puffer wurde vor der Verwendung über Aktivkohle gereinigt. Der Säulendurchfluß betrug 35 oder 60 ml pro Stunde.

Puffer: 147,02 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

6,06 g Tris

+ 25%ige HCl ad pH 7,5

ad 1000 ml

3.2.b. Bio-Gele P

Sphärische Polyacrylamidgele, Bio-Rad Laboratories

3.2.b.1. Bio-Gel P-2(100-200mesh)

An diesem System wurden Peptidlösungen bei Raumtemperatur in 0,1M Essigsäure entsalzt. Entsprechend den unterschiedlichen Probenvolumina wurden Säulen verschiedener Dimensionen verwendet:

5 x 60 cm		150-200 ml
3,5 x 50 cm	für Volumina von	70-100 ml
3,5 x 30 cm		40- 50 ml
3 x 25 cm		15- 20 ml

Die Durchflußraten betrugen zwischen 200 und 500 ml pro Stunde.

In einigen Fällen wurden die Säulen auch in den PC- oder DEAE-Startpuffern äquilibriert. Die Peptidlösungen wurden dann in diese Puffer umgesalzt und direkt weiter aufgetrennt.

3.2.b.2. Bio-Gel P-2(200-400mesh)

Die Trennungen wurden bei Raumtemperatur in einer Säule mit den Abmessungen 2,5 x 110 cm in 0,1M Essigsäure durchgeführt. Der Durchfluß betrug 35 ml pro Stunde.

3.2.c. Sephadex G-50 superfine

Pharmacia, Uppsala, Schweden

Die Trennungen wurden bei Raumtemperatur in Säulen mit den Abmessungen 2 x 150 cm durchgeführt. Eluiert wurde teilweise in 0,2M NH_4HCO_3 mit pH 8,5 (Durchfluß dann 20 ml pro Stunde) und teilweise in demselben Puffer mit 6M Harnstoff (Durchfluß dann 13 ml pro Stunde).

4. Spaltmethoden

4.1. Chemische Spaltungen

4.1.a. Spaltung mit Bromcyan an Methionin (50)

4.1.a.1. Spaltung von pol(I)-Ketten

Bromcyan p.A. von Merck, Darmstadt

Das Protein wurde in 70%iger Ameisensäure gelöst (5 mg/ml) und etwa 30 Minuten bei 45°C im Wasserbad denaturiert. Dann wurde der Ansatz mit N₂ begast und das durch Sublimation nachgereinigte Bromcyan (BrCN) in einem BrCN:Methionin-Verhältnis von 100:1 zugegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 30°C im Wasserbad wurde der Ansatz an Bio-Gel P-2 (100-200) entsalzt und gefriergetrocknet.

4.1.a.2. Spaltung von harnstoffunlöslichem Kollagen

Die zerkleinerte Haut (pro Ansatz etwa 400 g) wurde in 70%iger Ameisensäure (etwa 1 Liter) aufgeschlemmt und zwei Stunden bei 45°C im Wasserbad denaturiert. Dann wurde der Ansatz mit N₂ begast und 10 g Bromcyan zugegeben. Nach 4 Stunden Inkubation im Wasserbad bei 30°C wurde die Probe mit H₂O dest. auf das doppelte Volumen verdünnt und das überschüssige Bromcyan am Vakuumverdampfer über zwei Säulen mit NaOH-Plättchen und eine Kühlfalle abgezogen und zerstört. Während dieses Vorgangs wurde die Probe mehrfach mit H₂O dest. verdünnt. Anschließend wurden die Hautreste abzentrifugiert (60 Minuten bei 15.000 x g) und der Überstand an Bio-Gel P-2(100-200) entsalzt und gefriergetrocknet.

4.1.b. Spaltung von $\alpha 1(I)$ -CB 0,1 mit Hydroxylamin (51)

Hydroxylaminhydrochlorid von Merck, Darmstadt

3,43 g Hydroxylaminhydrochlorid wurden in 13 ml kaltem H_2O dest. gelöst. 2,5 ml 70%ige Natronlauge wurden tropfenweise unter kräftigem Rühren zugegeben, ebenso 5 ml 1M K_2CO_3 . Danach wurde der pH mit 6N HCl auf genau 9,0 eingestellt. In dieser für jeden Spaltversuch frisch hergestellten Lösung wurden 2 mg Protein pro ml Reagenz gelöst und zwei Stunden bei $45^\circ C$ im Wasserbad inkubiert. Dann wurde der pH mit 6N HCl auf 4 erniedrigt und die Probe an Bio-Gel P-2 (100-200) entsalzt und gefriergetrocknet.

4.2. Enzymspaltungen

4.2.a. Spaltung mit bakterieller Kollagenase

Kollagenase von Worthington Biochemicals, 383 U/mg

4.2.a.1. Spaltung von $\alpha 1(I)$ -Ketten und $\alpha 1(I)$ -CB 0,1

Das Protein wurde in 0,2M NH_4HCO_3 pH 7,8 gelöst (5-10 mg/ml). Die Enzymlösung (1 mg Kollagenase in 1 ml 1mM $CaCl_2$ /1mM HCl-Puffer) wurde im Enzym:Substrat-Verhältnis von 1:50 zugeetzt und der Ansatz 4 Stunden bei $37^\circ C$ im Wasserbad inkubiert. Danach wurde der Abbau durch Zugabe von Eisessig bis pH 4 gestoppt und die Probe an Bio-Gel P-2(100-200) entsalzt und gefriergetrocknet.

4.2.a.2. Spaltung von harnstoffunlöslichem Kollagen

Die zerkleinerte Haut (pro Ansatz etwa 400 g) wurde in 0,2M NH_4HCO_3 pH 7,8 aufgeschlemmt und 2 Stunden bei $45^\circ C$ denaturiert. Danach wurde die Enzymlösung (wie in 4.2.a.1. hergestellt) im Enzym : Haut-Verhältnis von 1:50.000 zugegeben. Nach 24 Stunden Inkubation bei $37^\circ C$ im Wasserbad wurde der Abbau durch Zusatz von Eisessig bis pH 4 gestoppt, die Probe abzentrifugiert (60 Minuten bei 15000 x g) und der Überstand

gegen 0,1M Essigsäure dialysiert. Der dabei entstehende Niederschlag wurde wieder abzentrifugiert (wie oben) und der Überstand gefrieretrocknet.

4.2.b. Spaltung von pal(I)-CB 0,1 und pal(I)-CB 0,1-CL 1 mit Trypsin

Trypsin TPCK von Worthington Biochemicals, 211 U/mg

Die Spaltungen mit Trypsin wurden analog der in 4.2.a.1. beschriebenen Methode durchgeführt. Die Spaltgemische wurden an Bio-Gel P-2(100-200) entsalzt.

4.2.c. Spaltung von pal(I)-CB 0,1-Tl mit Thermolysin

Thermolysin von Merck, Darmstadt, 6000 PU/mg

Diese Spaltung wurde ebenfalls analog der in 4.2.a.1. beschriebenen Methode durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug aber 20 Stunden. Das Spaltgemisch wurde nicht angesäuert, sondern direkt an Sephadex G-50s aufgetrennt (siehe 3.2.c.).

4.2.d. Spaltung von pal(I)-CB 0,1-CL 1 mit Clostripain (52)

Clostripain von Boehringer, Versuchslabor, Tutzing

Das Peptid wurde in 0,2M NH_4HCO_3 pH 7,8 gelöst (5 mg/ml), 2 mM Dithioerythrit zugegeben und das Enzym im Enzym: Substrat-Verhältnis von 1:100 zugesetzt. Nach 90 Minuten Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde der Abbau durch Zugabe von Eisessig bis pH 4 gestoppt und das Spaltgemisch direkt an Bio-Gel P-2(200-400) aufgetrennt.

4.2.e. Spaltung von pal(I)-CB 0,1-CL 1 und pal(I)-CB 0,1 mit der Staphylokokkus Protease V8 (53)

Staph. aureus-Protease von Miles Biochemicals, England, 450 units/mg

Das Protein wurde in 0,05M NH_4HCO_3 pH 7,8 gelöst (5 mg/ml)

und das Enzym im Enzym : Substrat-Verhältnis von 1:30 oder 1:20 zugegeben. Nach 20 Stunden Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde die Probe an Bio-Gel P-2(100-200) entsalzt.

4.2.f. Spaltung mit der Carboxypeptidase C (54)

Carboxypeptidase von Röhm GmbH, Darmstadt, 5000 mU/Flasche 0,5 Mikromol Protein wurden in 0,25 ml Natriumcitratpuffer (0,05M Zitronensäure mit NaOH auf pH 5,3 gestellt) gelöst, mit 0,25 ml Norleucinlösung (1,3 mg Norleucin/5 ml Citratpuffer) als internem Standard und mit 0,25 ml Carboxypeptidase C (5.000 mU/0,5 ml Citratpuffer) versetzt und im Wasserbad bei 30°C inkubiert. Nach 1,2,4,6,12,30,60,120,240,480 und 540 Minuten wurden je 50 Mikroliter entnommen, in Eppendorfgefäßen (Typ 3810⁺) mit 0,3 ml 0,2N HCl versetzt und tiefgefroren. Vor dem Auftragen auf den Aminosäureanalysator wurden die Proben 4 Minuten auf 70°C erhitzt und zentrifugiert.

5. Reduktion und Alkylierung

5.1. Reduktion und Carboxymethylierung (46)

Das Peptid wurde in 8M Harnstoff/0,1M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 gelöst (bis zu 10 mg/ml). Nach Begasen des Ansatzes mit N₂ wurden pro 10 mg Peptid 1mM Dithioerythrit (Serva, Heidelberg) zugegeben und die Probe 4 Stunden bei 37°C im Wasserbad reduziert. Danach wurde pro 10 mg Peptid 1mM Natriumjodacetat (Merck, Darmstadt) zugegeben und der pH mit 0,4N NaOH konstant auf 8,0 gehalten. Nach 1 Stunde Inkubation im Dunkeln wurde die Probe an Bio-Gel P-2(100-200) entsalzt und gefriergetrocknet.

5.2. Reduktion und Aminoäthylierung (55)

Das Peptid wurde in 8M Harnstoff/0,08M Tris-HCl pH 8,6 gelöst

(bis zu 10 mg/ml). Nach Begasen mit N_2 wurde wie in 5.1. Dithioerythrit zugegeben und 4 Stunden inkubiert. Danach wurde Äthylenimin monomer (Fluka, purissimum) bis zu einer Endkonzentration von 200 mM portionsweise zugegeben und der pH mit 1N HCl auf 8,0 gestellt. Nach 3 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde an Bio-Gel P-2(100-200) entsalzt und gefriergetrocknet.

6. Polyacrylamidgel-Elektrophorese in SDS (56)

Für die SDS-Diskelektrophorese wurden 6 cm lange Gele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 7,5% verwendet. Der Kammerpuffer enthielt 0,1M Phosphat mit pH 7,2 und 0,1% SDS (12,95 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ + 3,77 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$ + 50 ml 2%ige SDS-Lösung ag 1000 ml). Zum Probenauftrag wurden 20 - 40 μ g Peptidgemisch in 20 μ l 0,01M Phosphatpuffer mit pH 7,2 (wie Kammerpuffer, jedoch 0,2% SDS und 2M Harnstoff) gelöst. Die Trennung erfolgte bei einer Stromstärke von 6 mA/Gel (Laufrichtung zur Anode). Anfärbung und Fixierung wurde mit 0,25% Coomassie Brilliant Blue/ 20% TCA durchgeführt. Nach 1 Stunde Färbebad wurde etwa 24 Stunden in 7,5%iger Essigsäure entfärbt. Die Auswertung erfolgte densitometrisch an einem Chromoscan der Fa. Joyce-Loebl.

7. Aminosäureanalysen

0,2-0,5 mg Peptid wurden mit 1 ml 6N HCl versetzt und 24 Stunden bei $110^{\circ}C$ unter Stickstoff hydrolysiert. Die Proben wurden anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Zum Schutz der oxidationsempfindlichen Methionine und Cystine wurde der Hydrolyse 2-Mercaptoäthanol (1:2000) zugesetzt. Homoserinhaltige Peptide wurden nach dem Eindampfen 1 Stunde mit 1 ml 1%igem Piperidin bei $37^{\circ}C$ im Wasserbad inkubiert, um die Bildung von Homoserinlacton zu vermeiden und danach wieder eingedampft. Die Analysen

wurden in einem Einsäulenverfahren an einem automatischen Aminosäureanalysator (Multichrom, Beckman oder Durrum D 500) durchgeführt. Tryptophan wurde nach Hydrolyse des Peptides in 4N Methansulfonsäure (Pierce Chemical Comp., Rockford, Ill., USA) bestimmt. Cystein wurde entweder als Cystin oder nach Reduktion und Alkylierung als Carboxymethyl- beziehungsweise Aminoäthylcystein bestimmt.

8. Bestimmung von Molekulargewichten an der analytischen UZ

Die Peptide wurden in 0,1M NaCl/0,01M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 gelöst. Es wurde immer soviel Peptid gelöst, daß die Probe eine OD von 0,4 bei 280nm aufwies.

Die Messung und Auswertung wurde von Herrn Dr. Prieß (MPI f. Biochemie, Martinsried) durchgeführt.

9. Sequenzierung (57,58,59,60)

Die Sequenzanalyse der Peptide nach der Methode von Edman und Begg (58) wurde teilweise in einem "Protein-Peptide Sequencer" der Fa. Beckman Instruments, Palo Alto, Cal., USA durchgeführt. Zwei Peptide wurden außerdem in einem "solid-phase"-Sequenator (Eigenbau Dr. Wachter, Physiolog. Chem. Institut der LMU-München) untersucht. Die Umwandlung der ATZ-Derivate in die PTH-Aminosäuren erfolgte in 1N HCl in 10 Minuten bei 80°C. Die einzelnen Aminosäuren wurden mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatten F245, Merck, Darmstadt), Gaschromatographie (GC-45, Beckman Instruments oder Hewlett Packard 5700A), Rückhydrolyse zur freien Aminosäure (24 Std. unter N₂ bei 140°C) und Nachweis am Aminosäureanalysator (Durrum D 500) und gegebenenfalls am Massenspektrometer identifiziert (61). Die Sequenzierung am "solid-phase"-Sequenator wurde von Herrn Dr. Wachter, der Nachweis von PTH-Aminosäuren am Massenspektrometer von Herrn Dr. Schäfer (MPI f. Biochemie, Martinsried) durchgeführt.

ERGEBNISSE

1. Isolierung der Prokollagenpeptide nach Kollagenase- und Bromcyanspaltung von harnstoffunlöslichem Prokollagen

1.1. Isolierung des kollagenaseresistenten Teils (pal(I)-CB 0,1-CL 1) aus dem Prokollagenpeptidbereich

Die Isolierung von pal(I)-CB 0,1-CL 1 ist bereits in (47) ausführlich beschrieben. Das hier gezeigte Verfahren stellt eine weitere Rationalisierung der Methode dar.

Wesentliche Kriterien, die für die Isolierung ausgenutzt wurden, sind einmal, daß das Peptid nicht dialysabel ist und daher die vielen kleinen Kollagenasefragmente des Kollagens einfach durch Dialyse entfernt werden können; wichtiger aber noch ist der saure Charakter des Peptides. Dadurch bringt die Auftrennung des Abbaugemisches an DEAE-Cellulose bei pH 8,6 einen hohen Reinigungseffekt, weil pal(I)-CB 0,1-CL 1 bei relativ hoher Ionenstärke eluiert wird, während die meisten anderen Bestandteile des Abbaues bei diesen Bedingungen früher von der Säule gespült werden (Abbildung 6A).

Die weitere Reinigung des Peptides gelang durch Chromatographie an Agarose Al,5 und Rechromatographie an Phosphocellulose (Abbildungen 6B und 6C). Die Elution der entsprechenden Fraktion wurde jeweils durch einen Eichlauf mit aus pal(I)-Ketten hergestelltem Propeptid vorherbestimmt. Nach der PC-Chromatographie zeigte das Peptid in der SDS-

Diskelektrophorese eine einheitliche Bande (nicht gezeigt)
und erwies sich auch in der Aminosäurezusammensetzung als

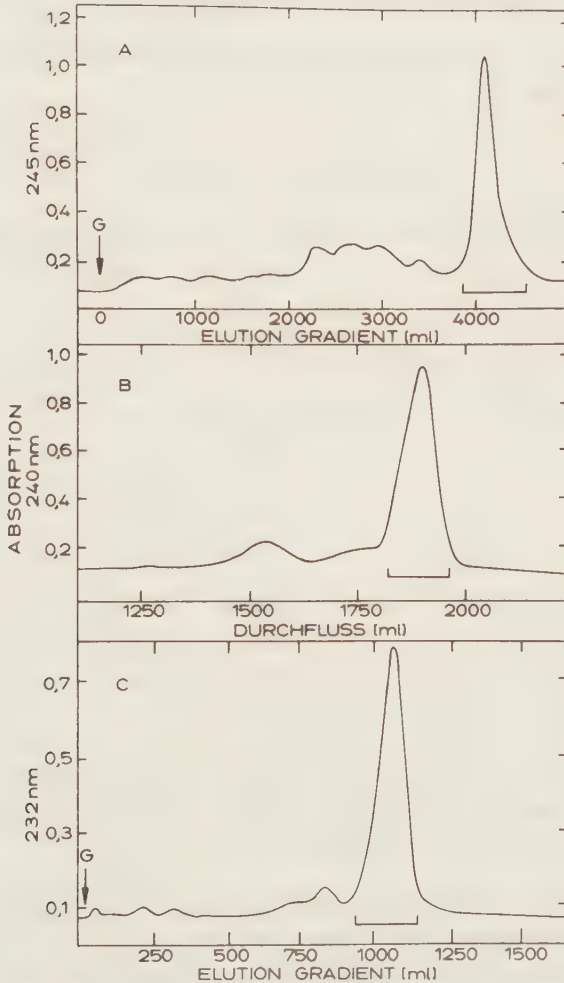


Abbildung 6: Isolierung von pal(I)-CB O,1-CL aus ULK über
DEAE-Cellulose (A), Agarose Al,5 (B) und
Phosphocellulose (C)
Details: siehe Exp. Teil

mit dem aus pal(I)-Ketten gewonnenen Peptid gleich. Das Molekulargewicht ergab sich nach Messungen an der UZ mit 10.700. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 110 pro Aminosäure ergibt sich daraus eine Größe von 97-98 Resten (Tabelle 1).

	pal(I)-CB 0,1-CL 1 aus pal(I)-Ketten	ULK
HYP	-	-
ASP	14,6	15,1
THR	6,0	5,8
SER	1,2	1,3
GLU	19,2	18,9
PRO	11,0	11,1
GLY	10,3	9,7
ALA	1,4	1,7
CYS	9,6	9,5
VAL	9,2	9,0
MET	-	-
ILE	2,4	2,5
LEU	3,2	3,1
TYR	0,9	1,1
PHE	-	-
HIS	1,0	1,0
LYS	4,1	3,8
ARG	2,9	3,1
TRY*	(1)	(1)
SUMME	98,0	98,0

*: Tryptophan wurde nach Methansulfonsäurehydrolyse bestimmt. Die Werte lagen immer sehr niedrig, so daß hier Try = 1 gesetzt ist, wie es die Sequenz ergab.

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung von pal(I)-CB 0,1-CL 1 berechnet auf ein MG von 10.700 und 98 Aminosäuren. Zum Vergleich ist die Zusammensetzung des aus pal(I)-Ketten isolierten Peptides angegeben.

Die Isolierung von pal(I)-CB 0,1-CL 1 bedeutete gleichzeitig die Isolierung von etwa 70% des Prokollagenpeptides. Die

restlichen 30% mußten auf andere Weise gewonnen werden. Nachdem die Experimente mit der Bromcyanspaltung immer nur sehr unbefriedigende Ergebnisse gebracht hatten, andererseits diese Methode als die weitaus günstigste erschien, wurde noch einmal eine Untersuchung an pal(I) -Ketten im analytischen Maßstab durchgeführt.

1.2. Analytische Voruntersuchung zur Bromcyanspaltung von pal(I) -Ketten

Kleine Mengen von pal(I) - und al(I) -Ketten wurden mit Bromcyan gespalten und an SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis dieses Experiments.

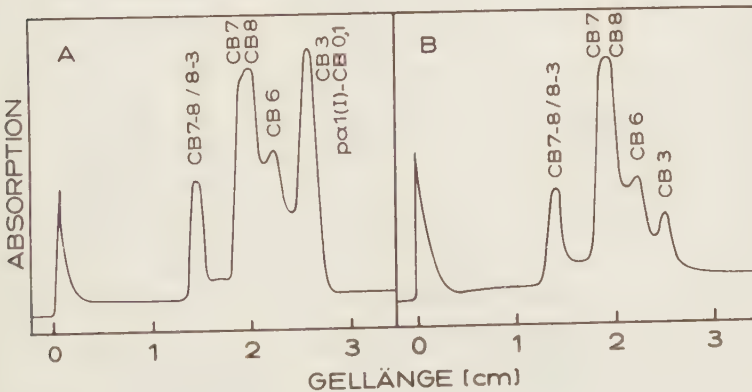


Abbildung 7: Auftrennung von Bromcyanspaltungen von pal(I) (A) und al(I) (B) an SDS-Polyacrylamidgelen.
Details: siehe Exp. Teil

Die Bromcyanpeptide (CB-Peptide) der al(I) -Kette sind bekannt und in die Abbildung eingetragen (49). Der wesentliche

Unterschied zwischen beiden Spaltungen zeigt sich im Bereich von $\alpha 1(I)$ -CB 3. Hier weist $\text{pal}(I)$ -Bromcyan eine zusätzliche starke Bande auf, die in etwa in dem Molekulargewichtsbereich von 15.000 liegt, den man für $\text{pal}(I)$ -CB 0,1 erwarten muß.

Dieses Ergebnis zeigte, daß zumindest unter den stark denaturierenden Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese das Peptid gut trennbar war.

Für die präparative Auftrennung der Bromcyanpeptide der $\text{pal}(I)$ -Kette wurde ein System gewählt, daß ebenfalls denaturierend wirkt - die Chromatographie an Agarose Al,5 in

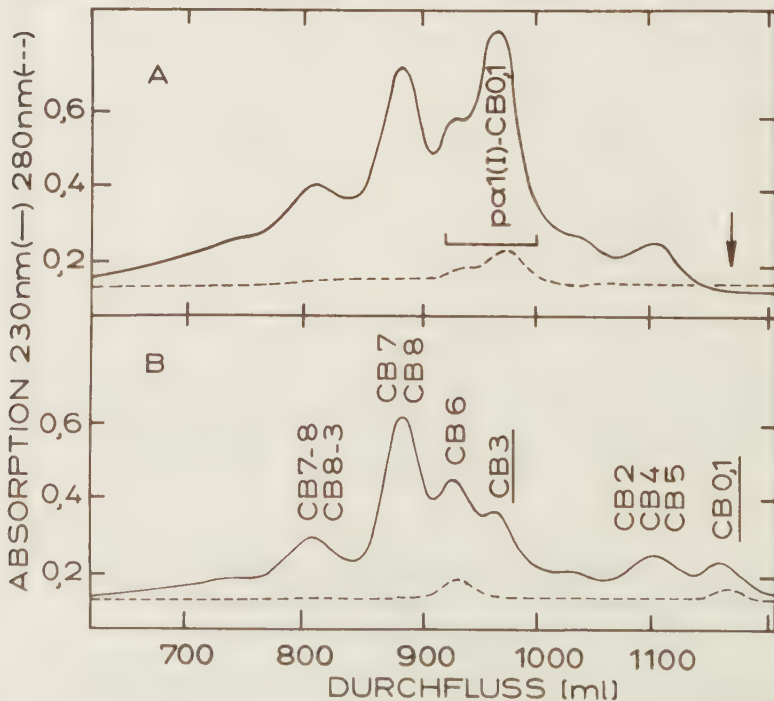


Abbildung 8: Auftrennung von Bromcyanspaltungen von $\text{pal}(I)$ - (A) und $\alpha 1(I)$ -Ketten (B) an Agarose Al,5
Details: siehe Exp. Teil

1M CaCl_2 . Abbildung 8 zeigt die vergleichende Chromatographie einer pal(I) - und einer al(I) -Spaltung. Zusätzlich zur Absorption bei 228nm wurde die Absorption bei 280nm gemessen; bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Seitenketten des Tyrosins und Tryptophans. Tyrosin findet sich nur im aminoterminalen (al(I) -CB 0,1) und im carboxyterminalen (al(I) -CB 6) Bromcyanpeptid der al(I) -Kette. Der Verbleib dieser Peptide war also anhand der 280nm-Absorption leicht zu verfolgen.

In Abbildung 8B sind die CB-Peptide der al(I) -Kette eingetragen (49). Wie erwartet, enthält nur al(I) -CB 6 und al(I) -CB 0,1 Absorption bei 280nm. Die Spaltung von pal(I) zeigt - wie schon am SDS-Gel - im Bereich von al(I) -CB 3 eine zusätzliche starke Absorption in beiden Wellenlängen. Während die 280nm-Absorption für al(I) -CB 6 erhalten bleibt, ist für die al(I) -CB 0,1 in beiden Wellenlängen verschwunden (Abbildung 8A).

Dieses Ergebnis bestätigt die Erwartung, daß pal(I) -CB 0,1 das Prokollagenpeptid und zusätzlich al(I) -CB 0,1 enthalten sollte. Die pal(I) -CB 0,1-Fraktion wurde, wie in Abbildung 8 angegeben, geschnitten und an Phosphocellulose weiter aufgetrennt. Da wiederum eine starke Affinität des Peptides zum Trenngel anzunehmen war, wurde dem Puffer 6M Harnstoff zugesetzt. Abbildung 9 zeigt diese Chromatographie, die wieder bei zwei Wellenlängen gemessen wurde.

Es ließen sich drei Fraktionen isolieren, die aufgrund ihrer

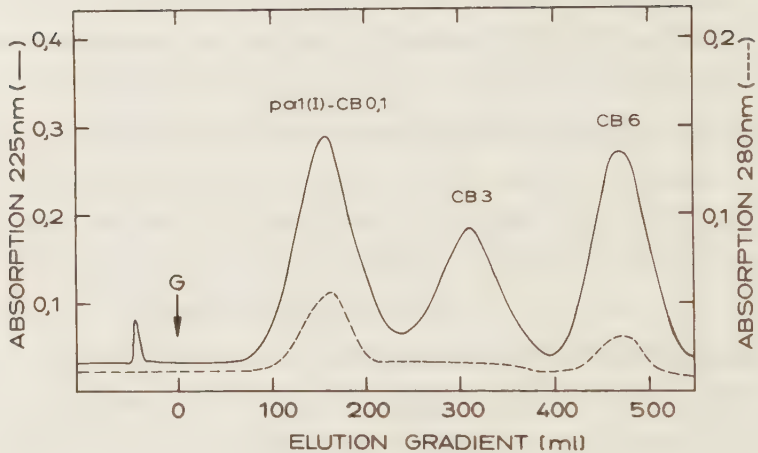


Abbildung 9: Rechromatographie der pal(I)-CB 0,1-Fraktion aus Abbildung 8 an Phosphocellulose

Details: siehe Exp. Teil

Absorption bei 280nm und durch Aminosäureanalysen als α 1(I)-CB 3, α 1(I)-CB 6 und pal(I)-CB 0,1 identifiziert werden konnten. Tabelle 2 zeigt die Aminosäurezusammensetzung von pal(I)-CB 0,1 im Vergleich zur Summe von pal(I)-CB 0,1-CL 1 und pal(I)-CB 0,1-CL 2. Das Molekulargewicht des Peptides ergab sich nach Messungen an der UZ mit 16.500. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 103 pro Aminosäure ergibt sich daraus eine Größe von etwa 160 Resten. Signifikante Unterschiede sind - wie die Differenzbildung zeigt - für Hydroprolin, Prolin und Glycin zu sehen. Das Auftreten gerade dieser für den tripelhelikalen Bereich des Kollagens typischen Aminosäuren steht in guter Übereinstimmung mit dem Befund, daß die bakterielle Kollagenase im Prokollagenpeptid spalten kann.

	pal(I)-CB 0,1	pal(I)-CB 0,1 CL 1	CL 2	Differenz (CB 0,1)-CL 1+2)
HYP	7,7	-	1	7
ASP	18,4	15	2	1
THR	6,6	6	1	
SER	3,9	1	3	
GLU	22,3	19	2	1
PRO	21,8	11	4	7
GLY	27,2	10	7	10
ALA	4,3	1	1	2
CYS	9,5	10	-	
VAL	10,1	9	1	
MET*	0,9	-	1	
ILE	4,3	2	1	1
LEU	6,1	3	2	1
TYR	2,5	1	2	
PHE	1,3	-	1	
HIS	1,1	1	-	
LYS	4,3	4	1	
ARG	5,2	3	-	2
TRY	(1)	(1)	-	
SUMME	157	97	30	32

*: Methonin wurde als Homoserin bestimmt

Die Werte für pal(I)-CB 0,1-CL 1 wurden Tabelle 1 Seite 30 entnommen und auf- oder abgerundet. Die Werte für pal(I)-CB 0,1-CL 2 wurden (47) entnommen und der Sequenz entsprechend korrigiert

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung von pal(I)-CB 0,1 im Vergleich mit der von pal(I)-CB 0,1-CL1 + CL2

Die früheren, vergeblichen Versuche zur Isolierung von pal(I)-CB 0,1 dürften darauf zurückzuführen sein, daß das Peptid eine hohe Affinität zu Ionenaustauschern wie CM-Cellulose und Phosphocellulose besitzt; durch den Zusatz hoher Harnstoffkonzentrationen läßt sich die Affinität aber so herabdrücken, daß das Peptid mit guten Ausbeuten (80%) isoliert werden kann.

1.3. Isolierung von pal(I)-CB 0,1 nach Bromcyanabbau von
harnstoffunlöslichem Kollagen

Für die Isolierung von pal(I)-CB 0,1 aus der mit Harnstoff vorextrahierten Resthaut wurde wiederum der saure Charakter des Peptides bei einer Chromatographie an DEAE-Cellulose bei pH 8,6 ausgenutzt. Abbildung 10 zeigt ein typisches Chromatogramm. Die Elution des Peptides wurde durch einen Eichlauf mit Peptid aus pal(I)-Ketten (1.2.) vorherbestimmt.

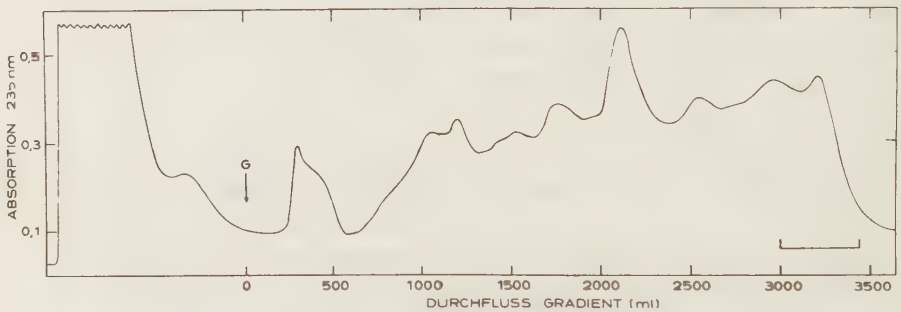


Abbildung 10: Auftrennung des Bromcyanabbaugemisches aus
harnstoffunlöslichem Kollagen
Details: siehe Exp. Teil

Die pal(I)-CB 0,1-Fraktion wurde, wie in Abbildung 10 angegeben, geschnitten und an Agarose Al,5 rechromatographiert (Abbildung 11).

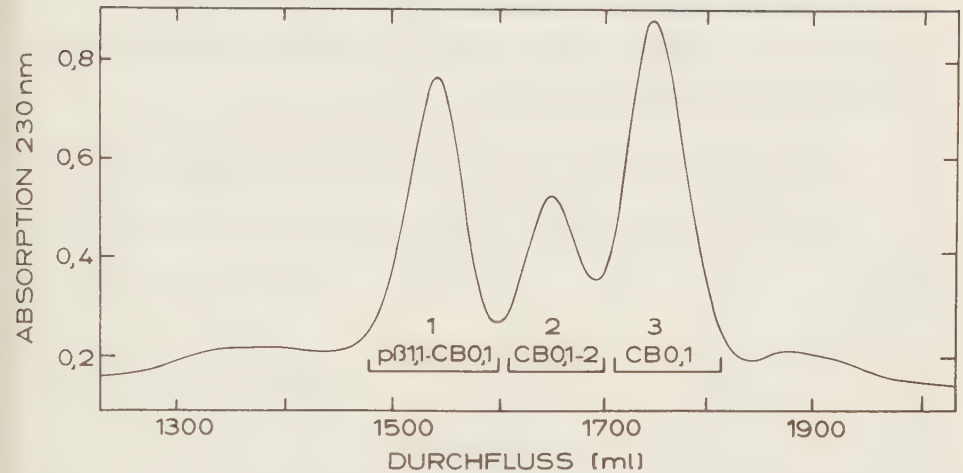


Abbildung 11: Rechromatographie der p α l(I)-CB 0,1-Fraktion
aus Abbildung 10 an Agarose A1,5
Details: siehe Exp. Teil

Dabei traten drei Hauptfraktionen auf. Fraktion 3 stellt nach Elutionsvolumen, Molekulargewicht und Aminosäurezusammensetzung p α l(I)-CB 0,1 dar. Fraktion 2 - sie eluiert mit etwas höherem Molekulargewicht als Fraktion 3 - enthält ein Doppelpeptid p α l(I)-CB 0,1-2, in dem das Methionin zwischen CB 0,1 und CB 2 nicht gespalten wurde. Solche Doppelpeptide treten auf, wenn das Methionin in oxidierter Form vorliegt und deshalb Bromcyan nicht mehr anlagern kann. α l(I)-CB 2 ist 36 Aminosäuren lang (49), so daß sich für das Doppelpeptid eine Größe von etwa 195 Resten ergibt. Fraktion 1 variierte

in der Menge erheblich. Im Abbau einer Haut, in der nur wenig Prokollagen enthalten war, wurde die Fraktion überhaupt nicht, im Abbau einer Haut mit viel Prokollagen dagegen in größeren Mengen gefunden.

	pal(I)- CB 0,1	CB 0,1-2	pß1,1(I)-CB 0,1
HYP	8	13	15
ASP	18	18	36
THR	7	8	14
SER	4	7	9
GLU	22	27	45
PRO	22	28	46
GLY	27	39	57
ALA	4	7	8
CYS	10	10	19
VAL	10	9	19
MET*	1	1	2
ILE	4	4	8
LEU	6	7	11
TYR	3	3	5,5
PHE	1	2	2
HIS	1	1	2
LYS	5	5	10
ARG	5	6	11
SUMME	158	194	319,5

*: Methionin wurde als Homoserin bestimmt

Tryptophan wurde nicht bestimmt

Die Werte wurden jeweils auf ganzzahlige Verhältnisse auf- oder abgerundet

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung von pal(I)-CB 0,1, pal(I)-CB 0,1-2 und pß1,1(I)-CB 0,1

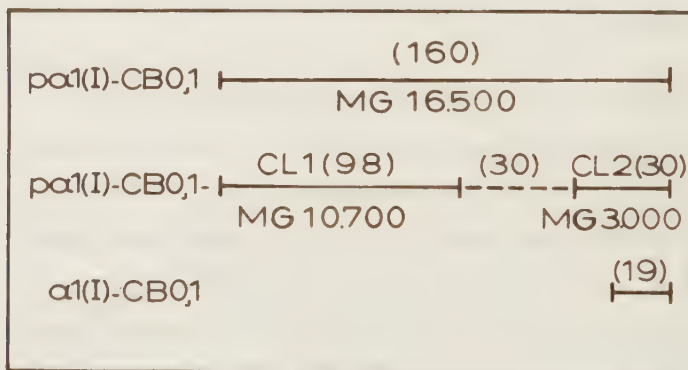
Nach der Aminosäurezusammensetzung ist das Peptid mit pal(I)-CB 0,1 identisch, besitzt aber kein doppelt so großes Molekulargewicht (32.000). Es handelt sich um ein Dimeres von pal(I)-CB 0,1. Da das Peptid nicht durch Reduktion in

monomeres $\alpha 1(I)$ -CB 0,1 überführt werden konnte, kann man annehmen, daß eine Quervernetzung über Lysin vorliegt, wie sie typischerweise im Kollagen vorkommt. Nachdem im Kollagen zwei $\alpha 1(I)$ -Ketten, die durch eine solche Lysinquervernetzung verknüpft sind als $\beta 1,1$ -Komponenten bezeichnet werden, wurde das dimere Peptid $\beta 1,1(I)$ -CB 0,1 genannt. Die Aminosäurezusammensetzung der drei Bromcyanpeptide ist in Tabelle 3 angegeben.

1.4. Zusammenfassung

1) Die Isolierung des Kollagenasefragments $\alpha 1(I)$ -CB 0,1-CL 1 und des Bromcyanfragments $\alpha 1(I)$ -CB 0,1 aus harnstoffunlöslichem Kollagen gelingt aufgrund der besonderen Eigenschaften der beiden Peptide. Sie enthalten sehr viele saure Aminosäurereste (Glu und Asp). An DEAE-Cellulose bei pH 8,6 werden die Peptide daher erst bei einer relativ hohen Ionenstärke von der Säule eluiert, während praktisch alle anderen Peptide und Hautbestandteile bereits vorher heruntergewaschen werden. Die weitere Reinigung der Peptide stellt dann kein Problem mehr dar. Sie wird durch Rechromatographie an Agarose A1,5 und gegebenenfalls an Phosphocellulose erreicht. $\alpha 1(I)$ -CB 0,1 muß allerdings, weil es eine hohe Affinität zu sauren Ionenaustauschern besitzt, in Puffern mit hoher Harnstoffkonzentration chromatographiert werden. Die Ausbeuten an Peptid nach den einzelnen Chromatographieschritten lagen durchschnittlich bei 80% der eingesetzten Menge.

2) $\alpha 1(I)$ -CB 0,1 hat nach Messungen an der UZ ein Molekulargewicht von 16.500. Das entspricht etwa 160 Aminosäuren. Die N-terminalen 98 Reste stellen auch das Peptid $\alpha 1(I)$ -CB 0,1 dar (MG 10.700) und haben nicht-kollagenen Charakter. Die C-terminalen 30 Reste stellen auch $\alpha 1(I)$ -CB 0,1-CL 2 dar, von dem wiederum die ersten 11 Reste noch zum Prokollagenpeptid gehören. Die letzten 19 Reste sind identisch mit $\alpha 1(I)$ -CB 0,1, dem N-terminalen Bromcyanpeptid der $\alpha 1(I)$ -Kette.



Zwischen diesen beiden Bereichen befindet sich ein Abschnitt, der kollagenasespaltbar ist und in viele kleine Fragmente zerlegt wird. Aus den errechneten Molekulargewichten läßt sich abschätzen, daß dieser Abschnitt aus rund 30 Aminosäuren bestehen sollte. Er besitzt - wie die Aminosäureanalysen zeigen - typisch kollagene Zusammensetzung (siehe Tabelle 2, S.35).

2. Fragmentierung von pal(I)-CB O,1 und pal(I)-CB O,1-CL 1

Die direkte Sequenzierung des Prokollagenpeptides war aus zwei Gründen nicht möglich: Erstens ist das Peptid mit etwa 140 Aminosäuren viel zu lang, um in einem Stück durchsequenziert werden zu können und zweitens ist der N-Terminus der pal(I)-Kette durch eine Pyrroglutaminsäure blockiert. Dadurch besitzt sie keine freie Aminogruppe, wie sie für den automatischen, schrittweisen Edmanabbau existieren muß (58).

Es mußten zunächst geeignete, überlappende Fragmente hergestellt werden. Haupthilfsmittel zur Isolierung solcher Bruchstücke sind proteolytische Enzyme. Im Fall des Prokollagenpeptides haben sich dafür besonders die Spaltung mit Clostripain am Arginin, sowie mit Trypsin am Arginin, Lysin und Aminoäthylcystein auf der einen Seite und die Spaltung mit der Stapphylokokken-Protease an Glutaminsäure auf der anderen Seite bewährt.

2.1. Spaltung von pal(I)-CB O,1-CL 1 mit Clostripain

pal(I)-CB O,1-CL 1 enthält drei Argininreste, von denen eines den C-Terminus bildet (47). Aus der Spaltung konnte also ein übersichtliches Gemisch von drei Peptiden erwartet werden. Damit die entstehenden Bruchstücke nicht durch die Disulfidbrücken verknüpft blieben, wurde das Peptid zunächst reduziert und carboxymethyliert und anschließend mit Clostripain gespalten.

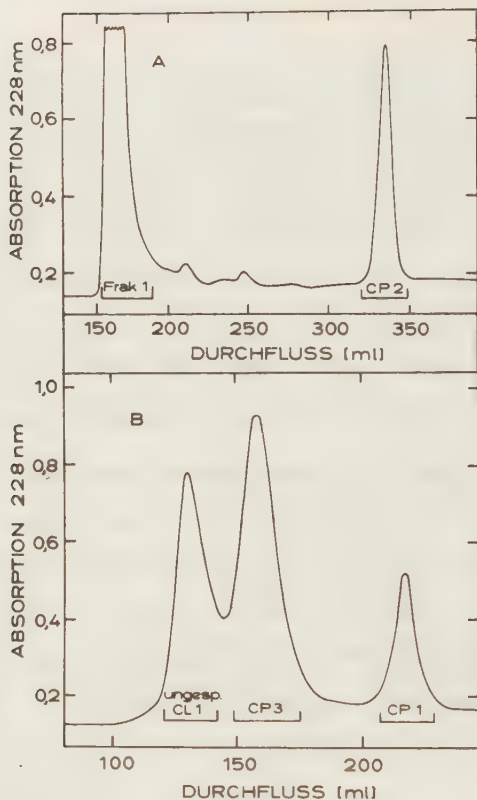


Abbildung 12: Auftrennung der CP-Peptide von $\text{pol(I)-CB O,1-CL 1}$ an Bio-Gel P-4 (200-400 mesh) (A) und Sephadex G-50s (B)

Details: siehe Exp. Teil

Die Auftrennung des Spaltgemisches an Bio-Gel P-4 ergab zwei Fraktionen, wobei die zweite reines $\text{pol(I)-CB O,1-CP 2}$ darstellt (Abb. 12 A). Die erste Fraktion erwies sich nach Rechromatographie an Sephadex G-50s als Gemisch aus ungespaltenem CL 1, $\text{pol(I)-CB O,1-CP 3}$ und -CP 1 (Abb. 12 B). CP 3 wurde durch Rechromatographie an demselben System von dem un-

gespaltenen CL 1 völlig abgetrennt.

Das Molekulargewicht und die Aminosäurezusammensetzung der drei Peptide CP1, CP2 und CP3 ergaben sich aus der Berechnung auf Arginin = 1,0. Danach besteht CP1 aus 24 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 2.700. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit 2.600, der aufgrund des Elutionsvolumens des Peptides an G-50s einer Eichkurve an dieser Säule entnommen wurde. Besonders bemerkenswert ist der mit über 40% sehr hohe Gehalt des CP1 an Glutamin bzw. Glutaminsäure.

	CP 1	CP 2	CP 3	Summe	CL 1
CMC	1,2	-	8,6	10	10
ASP	2,2	1,1	12,2	15	15
THR	1,0	-	5,1	6	6
SER	-	-	0,9	1	1
GLU	9,9	-	9,2	19	19
PRO	1,9	-	8,9	11	11
GLY	2,8	-	7,8	11	10
ALA	-	-	1,1	1	1
VAL	2,0	-	7,2	9	9
ILE	1,0	-	1,1	2	2
LEU	1,0	-	2,0	3	3
TYR	-	0,9	-	1	1
HIS	-	1,0	-	1	1
LYS	-	-	3,9	4	4
ARG	1,0	1,0	1,0	3	3
TRY	-	-	(1)	(1)	(1)
SUMME	24,0	4,0	70,0	98	97

Cystein wurde als Carboxymethylcystein bestimmt

Die Werte für CL 1 sind Tabelle 2 Seite 35 entnommen

Der Summe von CP 1 - CP 3 liegen die auf- oder abgerundeten Werte der einzelnen Peptide zugrunde

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung der CP-Peptide von
pal(I)-CB 0,1-CL 1

CP2 besteht nur aus vier Aminosäuren und enthält die beiden im Gesamtpeptid nur einmal vorkommenden Aminosäuren Tyrosin und Histidin. Damit ergibt sich - bei einer Gesamtsumme von 98 Resten - für CP3 ein Wert von 70 Aminosäuren, den man auch bei Berechnung auf Arginin = 1,0 erreicht.

Die Zuordnung der Peptide ergab sich folgendermaßen:

1. CP1 besitzt - wie ein Sequenzierungsversuch zeigte - wie CL1 einen blockierten N-Terminus.
2. CP2 enthält kein Prolin. Damit kann es nicht - wie CL 1 - die C-terminale Sequenz -Pro-Arg haben (47).
3. Damit ergibt sich für CP3 automatisch nur die C-terminale Position.

Die Reihenfolge der Peptide lautet also CP1, CP2, CP3. Für eine Sequenzanalyse geeignet waren CP2 und CP3, während CP1 erst weiter fragmentiert werden mußte.

2.2. Spaltung von pal(I)-CB O,1-CL 1 und pal(I)-CB O,1 mit Trypsin

Der Gehalt von pal(I)-CB O,1 und pal(I)-CB O,1-CL 1 an Lysinen und Argininen versprach nach tryptischer Spaltung eine nicht zu große Anzahl von Peptiden, die eine für die Sequenzanalyse gut geeignete Größenordnung haben sollten (siehe Tabellen 1 und 2, Seiten 30 und 35). Die Spaltung von zunächst unreduziertem Material sollte außerdem die Auftrennung insofern erleichtern, als zuerst alle nicht cysteinhaltigen Peptide abgetrennt und dann in einem zweiten Schritt die Cysteinpeptide nach Reduktion und Alkylierung isoliert werden konnten.

2.2.a. Auftrennung der nicht cysteinhaltigen Peptide

Die Spaltgemische wurden zunächst über Bio-Gel P-2 (100-200 mesh) entsalzt. Da über die Größe der entstehenden Fragmente mit Ausnahme derer, die auch nach Clostripainspaltung von pal(I)-CB O,1-CL 1 entstehen, nichts bekannt war, wurden sowohl die Peptid- als auch die Salzfraktionen dieser Chromatographie weiter untersucht.

Die Salzfraktionen wurden an Bio-Gel P-2 mit 200-400 mesh rechromatographiert; im Gegensatz zu Bio-Gel P-2 mit 100-200 mesh können an diesem System auch sehr kleine Peptide noch von Salz getrennt werden. Wie Abbildung 13, Seite 46 zeigt, konnten aus pal(I)-CB O,1-CL 1 zwei Peptide - T2 und T6 - isoliert werden (Abb. 13 A) und aus pal(I)-CB O,1 zusätzlich noch zwei weitere - T7 und T8 - (Abb. 13 B). Die Größe der

Peptide schwankt zwischen drei und acht Aminosäuren. Die Aminosäurezusammensetzungen sind in Tabelle 5, Seite 49, angegeben.

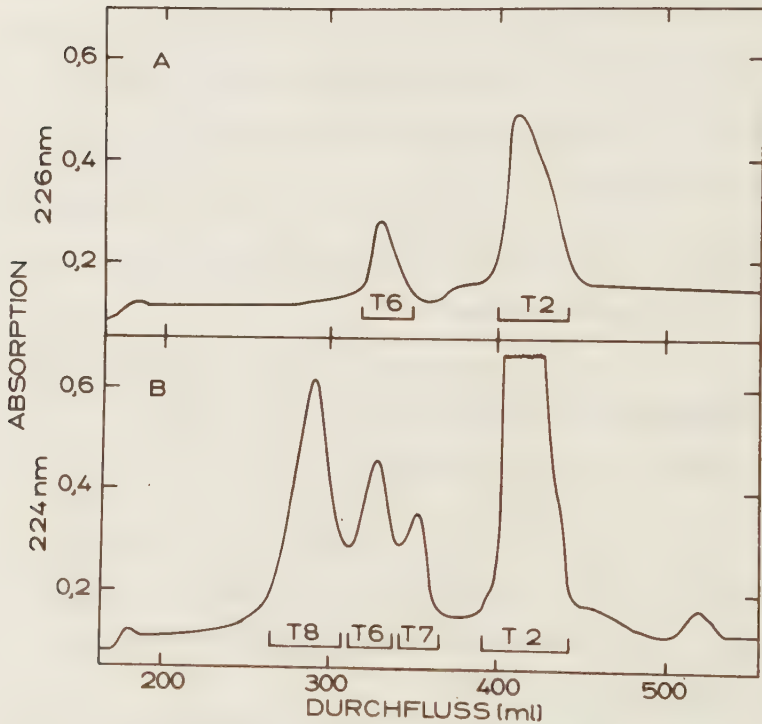


Abbildung 13: Rechromatographie der Salzfraktionen aus der P-2(100-200)-Entsalzung tryptischer Abbauten von pal(I)-CB 0,1-CL 1 (A) und pal(I)-CB 0,1 (B) an Bio-Gel P-2(200-400)
Details: siehe Exp. Teil

Die Peptidfraktionen aus der Entsalzung wurden zunächst an DEAE-Cellulose aufgetrennt (Abbildung 14).

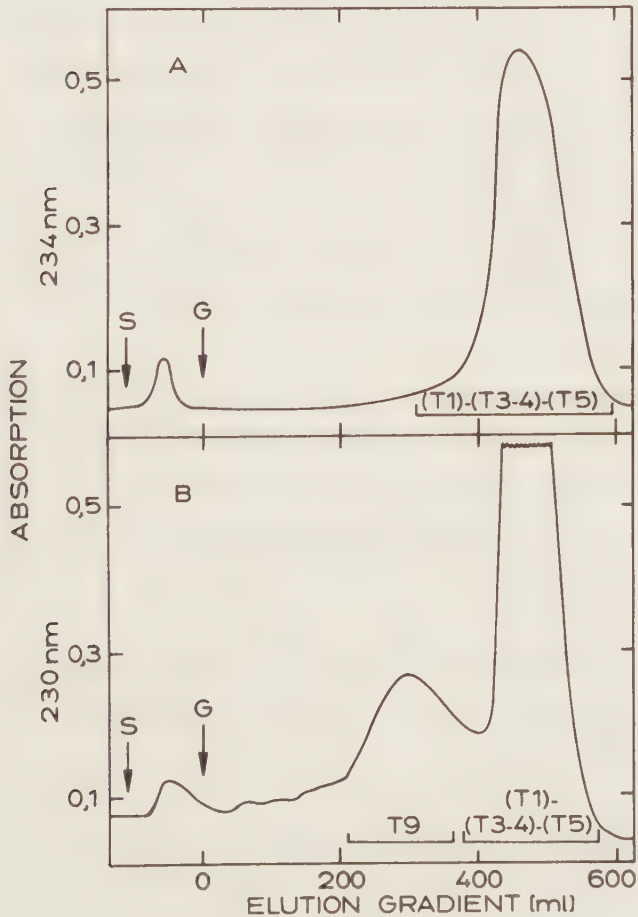


Abbildung 14: Chromatographie der Peptidfraktionen aus der P-2(100-200)-Entsalzung tryptischer Abbauten von $\text{pal(I)-CB } 0,1\text{-CL } 1$ (A) und $\text{pal(I)-CB } 0,1$ (B) an DEAE-Cellulose
Details: siehe Exp. Teil

Dabei konnte aus pal(I)-CB 0,1-CL 1 eine Fraktion isoliert werden, die sich nach Rechromatographie an Agarose Al,5 (nicht gezeigt) als einheitliches Peptid - (T1)-(T3-4)-(T5) - erwies und mit einem Molekulargewicht von etwa 9.600 eluierte. Aus pal(I)-CB 0,1 wurde zusätzlich noch eine zweite Fraktion erhalten. Die Rechromatographie dieser Fraktion erwies sich zunächst als schwierig, weil die Ausbeuten immer nur etwa 20% der eingesetzten Menge betrugen. Erst die Auftrennung an Sephadex G-50s in Natriumacetatpuffer mit 6M Harnstoff ergab eine einheitliche Fraktion - T9 - mit hohen Ausbeuten.

Die Aminosäurezusammensetzungen von (T1)-(T3-4)-(T5) und T9 sind in Tabelle 5, Seite 49, angegeben. Sie wurden einmal auf das an Agarose ermittelte Molekulargewicht von 9.600 bezogen (bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 110 pro Aminosäure ergibt das etwa 86 Reste) und zum anderen für T9 auf Homoserin = 1,0 berechnet (Homoserin muß = 1,0 sein, weil es das Umwandlungsprodukt des Methionins nach Bromcyanspaltung darstellt, also in einem Bromcyanpeptid nur einmal vorkommen kann).

2.2.b. Auftrennung von (T1)-(T3-4)-(T5) nach Reduktion und Alkylierung

Die Aminosäurezusammensetzung von (T1)-(T3-4)-(T5) - es enthält alle 10 Cysteine des Prokollagenpeptides und außerdem vier Lysin- und einen Argininrest - ließ vermuten, daß es aus mehreren disulfidverbrückten tryptischen Peptiden zusammen-

T1	T2	T3-4	T5	T6	Summe		T7	T8	T9	Summe	
					T1 - T6	CL 1				T1 - T9	CB 0,1
HYP	-	-	-	-	-	-	-	0,7	6,2	7	8
ASP	2,2	1,1	9,1	2,1	1,2	15	-	-	3,4	18	18
THR	0,9	-	-	3,7	0,9	6	-	-	0,9	7	7
SER	-	-	-	1,2	-	1	-	-	3,1	4	4
GLU	9,6	-	2,1	6,8	-	19	-	-	3,7	23	22
PRO	2,2	-	2,8	4,1	1,0	11	0,9	2,3	7,1	20	22
GLY	2,8	-	2,9	3,1	1,9	11	1,1	2,8	13,1	28	27
ALA	-	-	1,0	-	-	1	-	1,1	2,0	4	4
VAL	2,0	-	4,2	2,8	-	9	-	-	1,0	10	10
MET	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	1	1
ILE	1,1	-	1,0	-	-	2	-	-	1,8	4	4
LEU	1,0	-	2,0	-	-	3	-	-	2,7	6	6
TYR	-	-	-	-	-	1	-	-	1,6	3	3
PHE	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	1	1
HIS	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1
AEC	1,2	-	5,9	3,2	-	10	-	-	-	10	10
LYS	-	-	3,0	1,0	-	4	-	-	0,4	5	5
ARG	1,0	1,1	-	-	1,0	3	1,0	1,1	-	5	5
TRY	-	-	(1)	-	-	(1)	-	-	-	(1)	(1)
SUMME	24,0	4,0	35,0	28,0	6,0	97	3,0	8,0	49,1	157	158

Cystein wurde als Aminoäthylcystein bestimmt.

Methionin wurde als Homoserin bestimmt.

Tryptophan in T3-4 wurde durch die Sequenzanalyse nachgewiesen.

Den Summenbildungen liegen die jeweils auf- oder abgerundeten Werte der einzelnen Peptide zugrunde.

Tabelle 5: Aminosäurezusammensetzung aller Peptide aus der Trypsinspaltung von pal(I)-CB 0,1 und
pal(I)-CB 0,1-CL 1

gesetzt sein könnte. Nach Reduktion und Alkylierung sollte dann eine Isolierung der einzelnen Fragmente möglich sein.

Nach Reduktion und Aminoäthylisierung - die Einführung von Aminoäthylcystein (AEC) gibt die Möglichkeit, am AEC mit Trypsin nachzuspalten - wurde das Peptidgemisch zunächst wieder an Bio-Gel P-2(100-200) entsalzt.

Die Rechromatographie der Salzfraktion zeigte, daß sie kein Peptid enthält.

Die Auftrennung der Peptidfraktion an Phosphocellulose - nach Einführung so vieler basischer Gruppen in das Peptid erschien eine Auftrennung im sauren pH-Bereich sinnvoll - ergab drei gut getrennte Fraktionen, die jeweils ein einheitliches Peptid enthielten - T1, T5 und T3-4 - (Abb. 15).

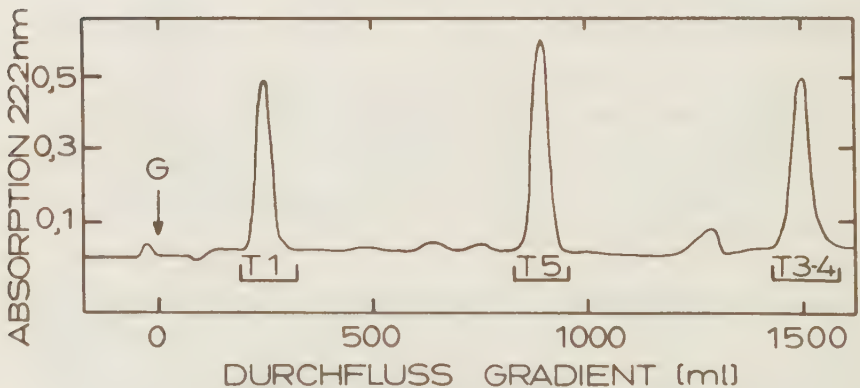


Abbildung 15: Auftrennung des Peptidgemisches nach Amino-äthylisierung von (T1)-(T3-4)-(T5) an Phosphocellulose pH 3,6
Details: siehe Exp. Teil

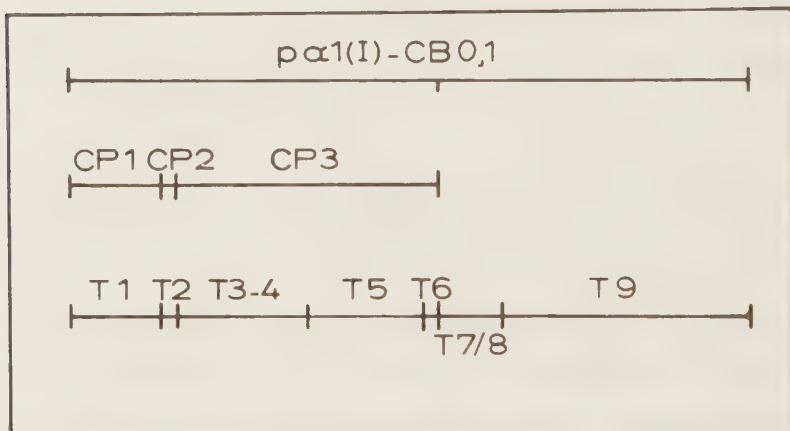
Die Molekulargewichte ergaben sich an Hand einer Eichkurve an Sephadex G-50s zwischen 2.500 für T1 und gut 3.000 für T3-4 und T5. Korrekturen erfolgten für T3-4 durch Berechnung auf Lysin = 3,0 und für T5 durch Berechnung auf Lysin = 1,0. Die so ermittelten Aminosäurezusammensetzungen sind in Tabelle 5, Seite 49, zusammengefaßt.

Die Ausbeuten aller Peptide lagen etwa bei 80% der eingesetzten Menge mit Ausnahme bei T3-4, dessen Ausbeute meist bei 40% lag. Besonders hohe Verluste gab es dabei während der Chromatographie an Phosphocellulose (Abb. 15); sie waren auch durch den Einsatz hoher Harnstoffkonzentrationen nicht ganz zu vermeiden.

Die Zuordnung der Peptide ergab sich aus der Zusammensetzung unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Clostripainspaltung von pal(I)-CB 0,1-CL 1 (siehe Seite 44), durch die die Position der drei Argininreste in CL 1 bereits festgelegt war. Die Peptide T1 bis T6 gehören zum Bereich von CL 1, weil sie in pal(I)-CB 0,1-CL 1 und in pal(I)-CB 0,1 vorkommen. T7 bis T9 gehören zum C-terminalen Bereich des Prokollagenpeptides, weil sie nur aus pal(I)-CB 0,1 isoliert werden können.

T1 und T2 sind in der Zusammensetzung identisch mit den Peptiden CP1 und CP2 (siehe Tab. 4, Seite 43) und dadurch als N-terminal festgelegt. Beide enden auf Arginin. T6, das dritte Argininpeptid aus CL 1, muß den C-Terminus von CL 1 bilden, weil dieses Arginin den C-Terminus von CL 1 darstellt. Die Peptide T3-4 und T5 konnten erst unter Zuhilfe-

nahme der Sequenzanalyse zugeordnet werden. So besitzt T3-4 die gleiche N-terminale Sequenz wie CP3 und ist damit als auf T2 folgend bestimmt. Damit steht dann T5 automatisch als zwischen T3-4 und T6 liegend fest.



Von den in $p\alpha 1(I)-CB 0,1$ zusätzlich vorhandenen Peptiden T7 bis T9 ist T9 aufgrund seines Gehaltes an Homoserin als das C-terminale Fragment festgelegt. Die beiden kleinen Peptide T7 und T8 konnten erst nach Sequenzierung überlappender Peptide in dieser Reihenfolge zugeordnet werden. Mit Ausnahme des blockierten Peptides T1 wurden alle tryptischen Fragmente für die Sequenzierung eingesetzt.

2.3. Nachspaltungen von pal(I)-CB O,1-Tl (=pal(I)-CB O,1-CPl)

Das Peptid pal(I)-CB O,1-Tl mußte für die Aufklärung der Sequenz weiter fragmentiert werden, weil der N-Terminus durch eine Pyrroglutaminsäure (pGlu) blockiert war.

Versuche, die Pyrroglutaminsäure enzymatisch abzuspalten, verliefen ergebnislos. Die zur Verfügung stehenden Enzympräparate hatten keine genügend hohe Spezifität, so daß Tl immer in eine Menge kleiner Peptide gespalten wurde.

2.3.a. Spaltung von Tl mit Trypsin

Das wie in 2.2.b beschrieben isolierte Peptid Tl enthält ein Aminoäthylcystein, daß sich als mit Trypsin spaltbar erwies. Die Auftrennung des Peptidgemisches erfolgte an Sephadex G-50s in einem verdampfbaren Puffer ($0,2M NH_4HCO_3$), so daß die entstehenden Peptidfraktionen sofort lyophilisiert werden konnten.

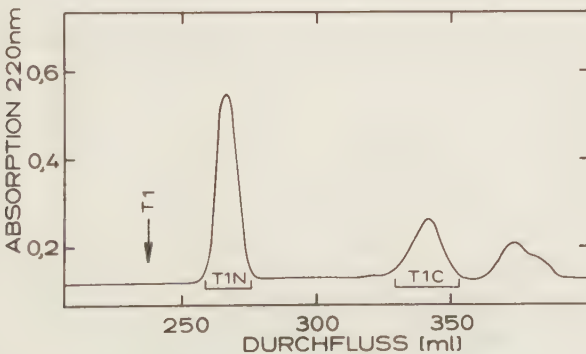


Abbildung 16: Auftrennung der Peptide aus der Trypsinspaltung von Tl aminoäthyliert
Details: siehe Exp. Teil

Wie in Abbildung 16 gezeigt, entstanden aus T1 zwei Peptide, die sich in einem Schritt sehr gut voneinander trennen ließen. Die Zuordnung ergab sich aus der Aminosäurezusammensetzung. Peptid T1N enthielt das Cystein, T1C das Arginin und ist deshalb das carboxyterminale Fragment. Tabelle 6, Seite 55, zeigt die Zusammensetzungen. Für die Sequenzierung war diese Spaltung relativ ungünstig, weil das sequenzierbare Peptid T1C nur sechs der 24 Aminosäuren von T1 enthält.

Es mußte daher eine weitere Spaltung gemacht werden.

2.3.b. Spaltung von T1 mit der Staphylokokken-Protease

T1 enthält als dominierenden Anteil 10 Reste Glutaminsäure, beziehungsweise Glutamin. Aus einer Spaltung mit der Staphylokokken-Protease (SP-Enzym) konnten also etliche Bruchstücke erwartet werden. Da aber nur Glutaminsäurebindungen und auch nicht Glu - Glu gespalten werden, wurde ein überschaubares Gemisch von Fragmenten erwartet.

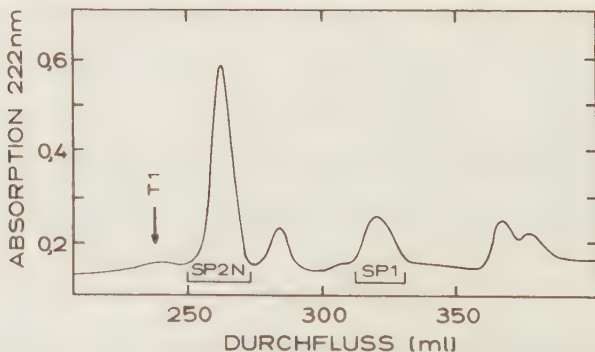


Abbildung 17: Auftrennung der Peptide aus der SP-Enzymspaltung von T1

Details: siehe Exp. Teil

Die Auftrennung an Sephadex G-50s (Abb. 17) zeigt, daß aus der Spaltung nur zwei Hauptfragmente entstehen - SP1 und SP2N -, die sich gut voneinander trennten. Die Aminosäureanalyse ergab, daß SP1 aus 7 und SP2N aus 17 Resten besteht (Tabelle 6). SP2N enthält sowohl das Cystein als auch das Arginin und stellt somit das C-terminale Peptid dar. Damit standen schon 17 der 24 Reste von T1 für die Sequenzierung zur Verfügung.

Die N-terminalen 7 Aminosäuren setzen sich aus 6 Glutaminsäuren, beziehungsweise Glutaminen und einem Glycin zusammen. Das Glycin konnte dabei weder die aminoterminalen noch die carboxyterminalen Aminosäure sein. Zur Bestimmung der Se-

	T1	T1N	T1C	SP1	SP2N	SP1-Th1	SP1-Th2
ASP	2	1,0	1,1	-	2,1	-	-
THR	1	0,9	-	-	0,9	-	-
SER	-	-	-	-	-	-	-
GLU	10	8,9	0,9	5,9	3,9	3,9	(2)
PRO	2	1,9	-	-	2,0	-	-
GLY	3	2,1	1,2	1,0	1,9	1,0	-
ALA	-	-	-	-	-	-	-
VAL	2	1,1	0,8	-	2,0	-	-
ILE	1	0,9	-	-	1,1	-	-
LEU	1	-	1,0	-	1,0	-	-
TYR	-	-	-	-	-	-	-
HIS	-	-	-	-	-	-	-
AEC	1	1,2	-	-	1,1	-	-
LYS	-	-	-	-	-	-	-
ARG	1	-	1,0	-	1,0	-	-
SUMME	24	18,0	6,0	6,9	17,0	4,9	(2)

Cystein wurde als Aminoäthylcystein bestimmt

Die Werte für T1 sind der Tabelle 5, Seite 49, entnommen und auf- oder abgerundet worden

Tabelle 6: Aminosäurezusammensetzungen der Nachspaltpeptide von pal(I)-CB 0,1-T1

quenz mußte also nur die Position des Glycins zwischen den Stellen 2 bis 6 festgestellt werden.

Zu diesem Zweck wurde SP1 noch weiter fragmentiert. Verwendet wurde ein Enzym, daß bevorzugt Gly - X - Bindungen spaltet und nicht C-terminal von sauren Resten - Thermolysin.

2.3.c. Spaltung von T1-SP1 mit Thermolysin

Das Spaltungsgemisch wurde wieder an Sephadex G-50s aufgetrennt. Abbildung 18 zeigt diese Chromatographie. Von den drei entstandenen Fraktionen - Th1, Th2 und "Salz" - wurden

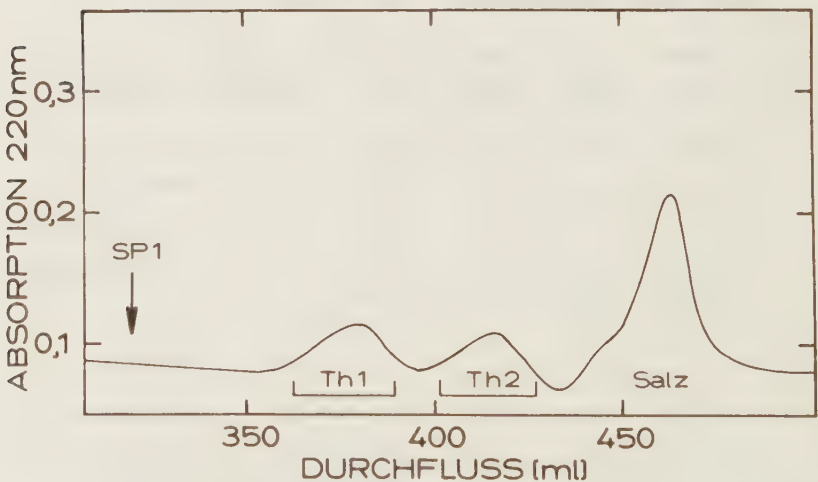


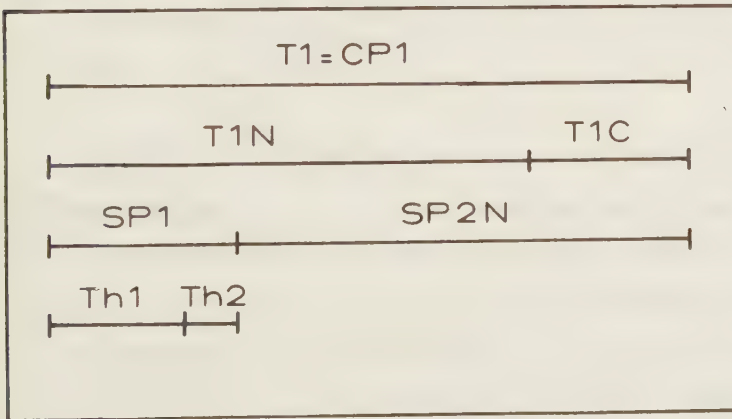
Abbildung 18: Auftrennung der Peptide aus der Thermolysin-spaltung von α 1(I)-CB 0,1-T1-SP1
Details: siehe Exp. Teil

gleiche Aliquots entnommen, hydrolysiert und die Aminosäure-

zusammensetzung bestimmt. Dabei zeigte sich, daß Th1 als einzige Fraktion neben Glutaminsäure auch Glycin enthält. Die quantitative Auswertung ergab 6 nMol Glycin und 25 nMol Glutaminsäure, also ein Verhältnis von 4:1. Th2 enthielt nur Glutaminsäure und zwar 11,5 nMol. Die "Salzfraktion" enthielt kein Peptid.

Nach der Spaltungsspezifität von Thermolysin muß Th1 das N-terminale Peptid sein und auf Glycin enden. Bei einem Verhältnis von Glu : Gly = 4:1 kann das Glycin damit nur in der Sequenzposition 5 stehen. Th2 stellt dann die darauf folgenden zwei Reste dar.

Mit Hilfe dieser Methode konnte also die N-terminale Sequenz von T1 wahrscheinlich gemacht werden. Über die Ver-



teilung von Glutamin und Glutaminsäure auf die einzelnen Positionen kann nur gesagt werden, daß Position 1 ein pGlu und Position 7 ein Glu (Spezifität des SP-Enzyms) ist.

2.4. Spaltung von pal(I)-CB O,1-CL 1 und pal(I)-CB O,1 mit der Staphylokokken-Protease (SP-Spaltung)

Diese Spaltung diente hauptsächlich dazu, überlappende Bruchstücke zu den Trypsinpeptiden zu isolieren, um so die Zuordnung der tryptischen Fragmente zu bestätigen und die Sequenzierung über die Trypsinspaltstellen hinweg zu ermöglichen. Für diesen Zweck schien die Spaltung an sauren Aminosäuren als Alternative zur Spaltung an basischen Resten besonders geeignet.

2.4.a. Spaltung von pal(I)-CB O,1-CL 1

Die Spaltung wurde wieder am zunächst unreduzierten Peptid durchgeführt und die nicht cysteinhaltigen Bruchstücke isoliert; in einem zweiten Schritt wurden dann die nach Reduktion und Aminoäthylierung entstehenden Peptide aufgetrennt.

2.4.a.1. Isolierung der nicht cysteinhaltigen Bruchstücke

Das Spaltgemisch wurde zunächst an Bio-Gel P-2(100-200 mesh) entsalzt. Sowohl die Peptid- als auch die Salzfraktion wurden weiter untersucht.

Die Peptidfraktion wurde an Sephadex G-50s aufgetrennt. Wie in Abbildung 19, Seite 59, gezeigt, spaltet sie dabei in zwei gut voneinander getrennte Fraktionen - (SP2)-(SP3) und SP4/SP5N - auf. (SP2)-(SP3) erwies sich nach Rechromatographie an Phosphocellulose als einheitliches Peptid. Die

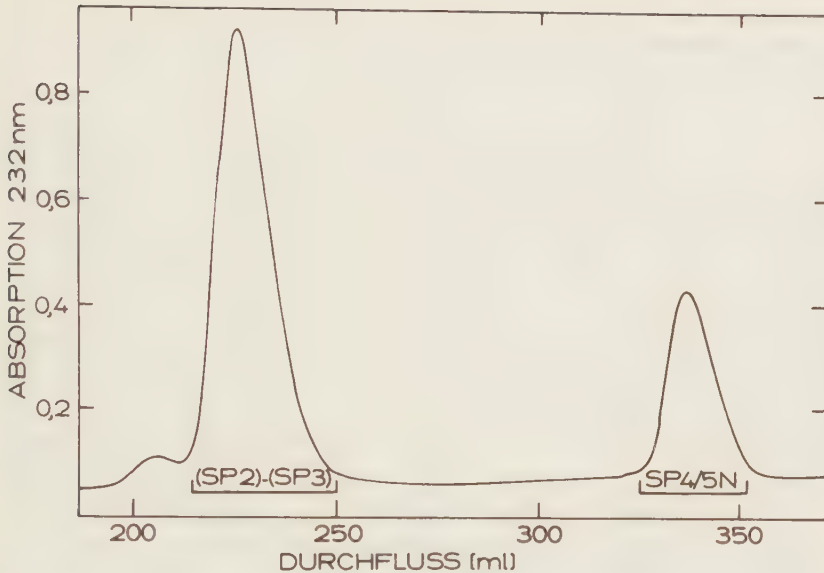


Abbildung 19: Auftrennung der Peptidfraktion aus der Entsalzung des SP-Abbaues von $\text{pal(I)-CB 0,1-CL 1}$ an Sephadex G-50s
Details: siehe Exp. Teil

Abschätzung der Größe des Peptides erfolgte unter Zuhilfenahme der Aminosäureanalyse (Tabelle 7, Seite 64). Es enthält Tyrosin und Histidin, die beide in $\text{pal(I)-CB 0,1-CL 1}$ nur je einmal vorkommen. Setzt man beide gleich 1,0, so ergibt sich ein Wert von 66 Resten für (SP2)-SP3). Das bedeutet, daß etwa 30 Reste zum vollständigen Peptid abgespalten wurden. Die Elution von SP4/5N deutete aber Größen von 10-15 Resten an, so daß die Vermutung nahe lag, es könnten in der Fraktion zwei Peptide enthalten sein. Deshalb wurde sie an DEAE-Cellulose rechromatographiert (Abbildung 20, Seite 60). Dabei wurden zwei gut getrennte Fraktionen - SP5N

und SP4 - erhalten.

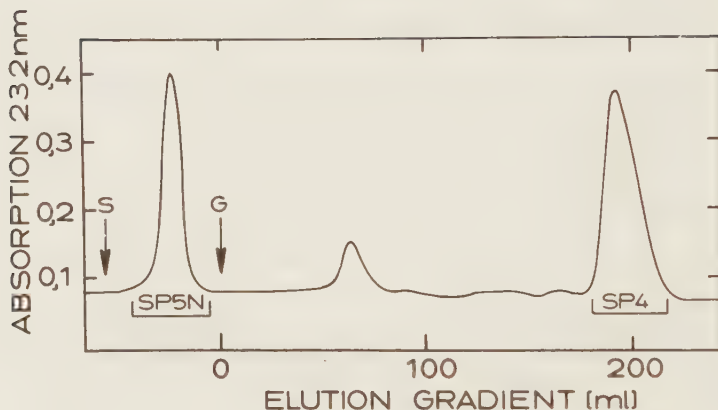


Abbildung 20: Rechromatographie der Fraktion SP4/5N aus
Abb. 19 an DEAE-Cellulose
Details: siehe Exp. Teil

Die Aminosäurezusammensetzungen der beiden Fraktionen ist in Tabelle 7, Seite 64, angegeben. Aufgrund seines Gehaltes an Serin (pul(I)-CB 0,1-CL1 enthält nur ein Serin) wurde SP4 auf 9 Reste berechnet. SP5N besteht mit Lysin und Arginin gleich 1,0 aus 14 Aminosäuren.

Die Rechromatographie der Salzfraktion aus der Entsalzung der SP-Spaltung an Bio-Gel P-2(200-400 mesh) brachte dann noch ein weiteres Peptid - das bereits aus der SP-Spaltung von pul(I)-CB 0,1-T1 bekannte SP1 (Abbildung 21; siehe auch Seite 54). Seine charakteristische Zusammensetzung ist ebenfalls in Tabelle 7, Seite 64, angegeben.

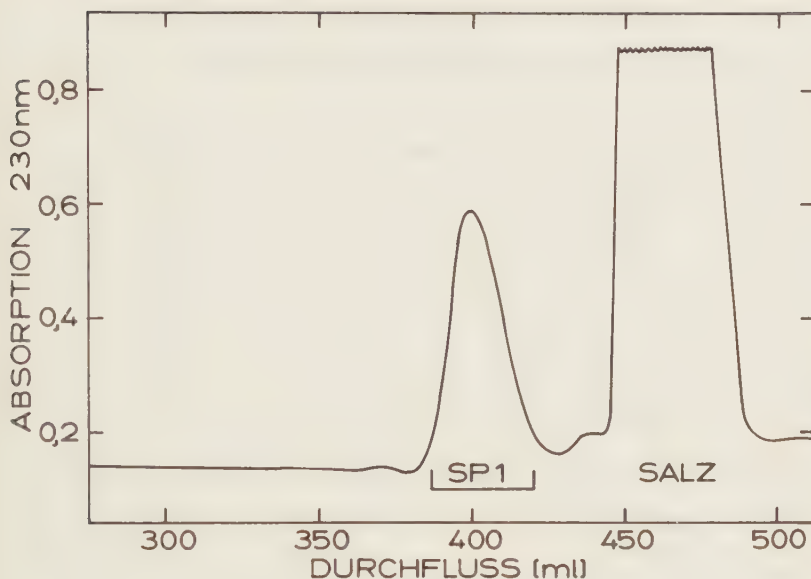


Abbildung 21: Auftrennung der Salzfraktion aus der Entsalzung des SP-Abbaues von pol(I)-CB 0,1-CL 1 an Bio-Gel P-2(200-400 mesh)

Details: siehe Exp. Teil

Trotz der großen Anzahl an Glutaminen, beziehungsweise Glutaminsäuren, waren damit zunächst nur vier Peptide isoliert.

2.4.a.2. Isolierung der Cysteinfragmente

Wie schon bei der Trypsinspaltung, enthielt auch bei der SP-Spaltung ein Peptid alle 10 Cysteine - (SP2)-(SP3) -. Infolge des hohen Gehaltes an Glutamin/-säure war zu vermuten, daß es nach Reduktion und Alkylierung in mehrere Fragmente zerfallen würde.

Das aminoäthylierte Peptid wurde wieder an Sephadex G-50s aufgetrennt und zerfiel in zwei Fraktionen - SP2 und SP3 -.

Abbildung 22 zeigt diese Auftrennung. Beide Peptide erwiesen sich bei Rechromatographie an Phosphocellulose

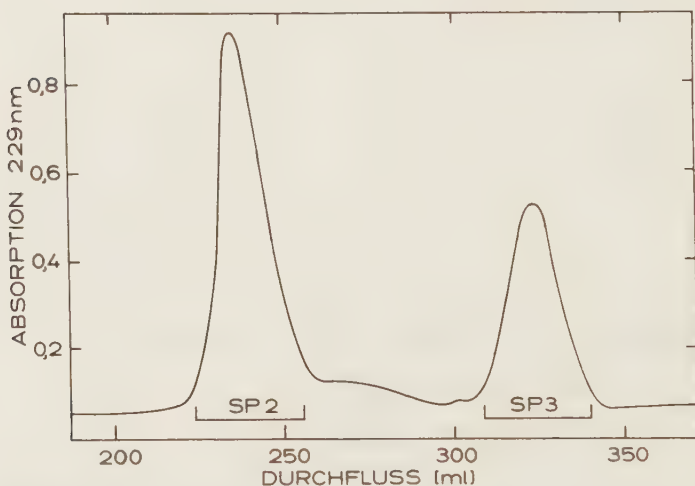
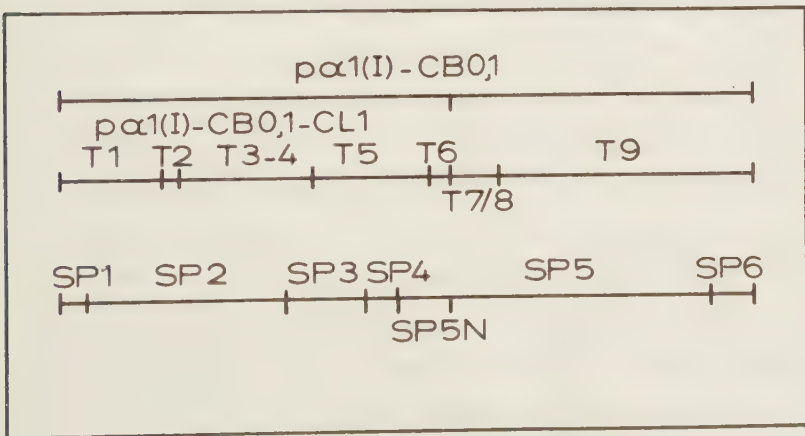


Abbildung 22: Auftrennung der nach Aminoäthylierung von (SP2)-(SP3) entstehenden Peptide an Sephadex G-50s
Details: siehe Exp. Teil

als einheitlich (nicht gezeigt). SP2 enthält wieder das Tyrosin und das Histidin und wurde auf dieser Basis mit 46 Aminosäuren berechnet. Der Wert stimmt auch gut mit dem Molekulargewicht von 5.000 überein, daß für SP2 einer Eichkurve an Sephadex G-50s entnommen wurde. Für SP3 ergab sich damit aus der Differenz von (SP2)-(SP3) und SP2 eine Größe von 20 Resten. Die Zusammensetzungen sind in Tabelle 7, Seite 64, zusammengefaßt.

Die Zuordnung der Peptide ergab sich aus dem Vergleich der

Aminosäurezusammensetzungen mit der der tryptischen Peptide. SP1 bildet das N-terminale Peptid, wie die Spaltung von $\alpha 1(I)$ -CB 0,1-T1 (siehe Seite 54) bereits gezeigt hatte. SP2 enthält die Kombination von zwei Arginin-, einem Tyrosin-, einem Histidin- und einem Lysinrest. Sie ist nur im Überlappungsbereich von T1, T2 und T3-4 möglich. Da T1 nur eine SP-Spaltstelle besitzt, beginnt SP2 also direkt im Anschluß an SP1 und reicht bis weit in T3-4 hinein. Das dritte Arginin in CL1 ist in SP5N enthalten, das also carboxiterminal liegt (siehe Seite 44). SP4 enthält - wie T5 - ein Serin, während SP3 zwei Lysine enthält. Damit muß SP3 ein Überlappungspeptid von T3-4 und T5 sein; SP4 liegt mit-ten in T5.



Damit ergibt sich die lückenlose Zuordnung aller aus der SP-Spaltung isolierter Peptide in der Reihenfolge SP1-SP2-SP3-SP4-SP5N vom N- zum C-Terminus.

	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5N	Summe SP1-SP5N	CL 1	SP5	SP6	Summe SP1-SP6	CB O,1
HYP	-	-	-	-	-	-	-	7,4	-	7	8
ASP	-	10,1	3,1	1,0	1,1	15	15	4,2	-	18	18
THR	-	1,1	1,1	0,8	3,0	6	6	2,2	0,9	6	7
SER	-	-	-	1,0	-	1	1	1,4	1,8	4	4
GLU	5,9	6,0	1,8	4,1	1,0	19	19	4,4	-	22	22
PRO	-	5,1	3,2	1,0	2,1	11	11	11,4	2,1	22	22
GLY	1,0	2,7	0,9	1,1	3,8	10	10	18,6	2,2	26	27
ALA	-	-	0,8	-	-	1	1	2,6	-	4	4
VAL	-	6,0	2,1	-	1,0	9	9	1,2	1,0	10	10
MET	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	1	1
ILE	-	2,2	-	-	-	2	2	1,2	1,1	4	4
LEU	-	2,0	1,1	-	-	3	3	3,0	-	6	6
TYR	-	0,8	-	-	-	1	1	1,5	-	3	3
PHE	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	1	1
HIS	-	1,0	-	-	-	1	1	-	-	1	1
ABC	-	6,2	4,2	-	-	10	10	-	-	10	10
LYS	-	1,0	1,9	-	1,0	4	4	1,0	0,3	5	5
ARG	-	1,8	-	-	1,0	3	3	2,9	-	5	5
TRY	-	(1)	-	-	-	(1)	(1)	-	-	(1)	(1)
SUMME	6,9	46,0	20,0	9,0	14,0	97	97	63,0	10,3	155	158

Cystein wurde als Aminoäthylcystein bestimmt.

Methionin wurde als Homoserin bestimmt.

Tryptophan in SP2 wurde durch Sequenzanalyse nachgewiesen.

Den Summenbildungen liegen die jeweils auf- oder abgerundeten Werte der einzelnen Peptide zugrunde.

Tabelle 7: Aminosäurezusammensetzung aller Peptide aus der Staphylokokkus aureus-Proteasespaltung von pal(I)-CB O,1-CL 1 und pal(I)-CB O,1

2.4.b. Spaltung von pal(I)-CB 0,1

Diese Spaltung wurde mit dem Ziel durchgeführt, ein Überlappungspeptid für die tryptischen Fragmente T6 bis T9 (siehe Seite 52) zu isolieren. T6, 7 und 8 enthalten keine Glutaminsäure, so daß man nach SP-Spaltung ein Peptid SP5 aus diesem Bereich erwarten konnte, das wie SP5N beginnt und mindestens bis in T9 hineinläuft.

Da man annehmen mußte, daß auch dieses Peptid - wie T9 - nur schlecht chromatographierbar sein würde, mußte die Auftrennung des Spaltgemisches an Sephadex G-50s in 0,2M NH_4HCO_3 mit 6M Harnstoff durchgeführt werden. In 6M Harnstoffpuffern reduziert sich die Trennfähigkeit von Sephadex G-50s erheblich. Um trotzdem die Isolierung des gesuchten Peptides SP5 möglichst einfach zu machen, wurde die Spaltung mit einer hohen Enzymkonzentration (Enzym: Substrat = 1:20) durchgeführt. Bei diesen Bedingungen werden neben den bereits in 2.4.a. beschriebenen Bindungen noch weitere zumindest teilweise gespalten. Außerdem wurde als Ausgangsmaterial das bereits reduzierte und aminoäthylierte pal(I)-CB 0,1 eingesetzt. Beide Maßnahmen dienten dazu, die aus dem bereits bekannten Bereich von pal(I)-CB 0,1-CL 1 entstehenden Peptide möglichst klein zu machen, so daß SP5 das größte entstehende sein sollte. Damit sollte es dann an G-50s gut von den anderen abzutrennen sein.

Abbildung 23 zeigt die Auftrennung des Spaltgemisches.

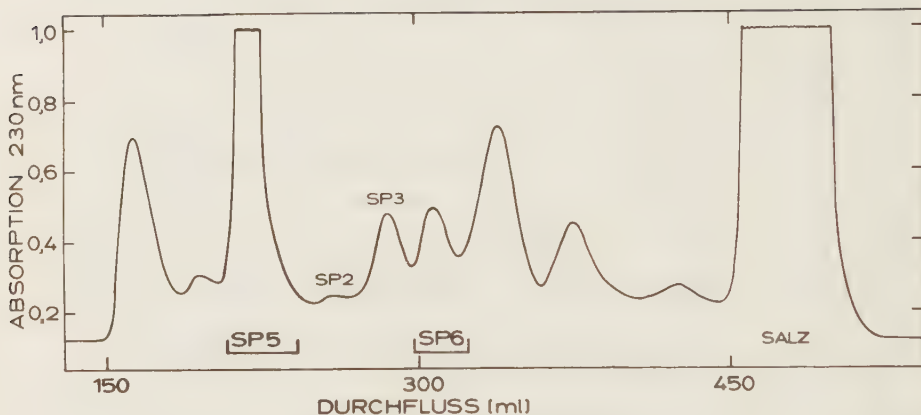


Abbildung 23: Auftrennung des Spaltgemisches aus der SP-Spaltung von $\alpha 1(I)$ -CB 0,1 an Sephadex G-50s
Details: siehe Exp. Teil

Die Identifizierung des gesuchten Peptides SP5 erfolgte an Hand der Aminosäurezusammensetzung, über die aus der Trypsin-spaltung Voraussagen gemacht werden konnten. So mußte SP5 spezifisch Hydroxyprolin enthalten. Diese Aminosäure wurde nur in der Fraktion SP5 (Abb. 23) gefunden.

Nach Rechromatographie an demselben System ergab sich SP5 als reines Peptid. Seine Länge wurde aus dem Gehalt an Arginin und Lysin berechnet. Es mußte die drei Arginine von T6, 7 und 8 und außerdem das Lysin von T5 enthalten (siehe Tabelle 5, Seite 49). Bei Berechnung auf diese Werte ergab sich eine Länge von 63 Aminosäuren. Damit reicht SP5 bis in $\alpha 1(I)$ -CB 0,1 hinein, umfaßt also den gesamten C-terminalen Teil des Pro-kollagenpeptides (siehe 1.4., Seite 39).

Nachdem es kein Homoserin enthält, mußte es noch ein weiteres Peptid geben, das den C-Terminus von pal(I)-CB O,1 bildet. Dieses Peptid SP6 konnte ebenfalls abgetrennt werden (Abbildung 23, Seite 66). Es besteht aus 11 Aminosäuren. Die Zusammensetzungen von SP5 und SP6 sind in Tabelle 7, Seite 64, angegeben.

2.5. Zusammenfassung

In Abbildung 24 sind noch einmal alle Peptide dargestellt, die aus den verschiedenen Spaltungen isoliert wurden.

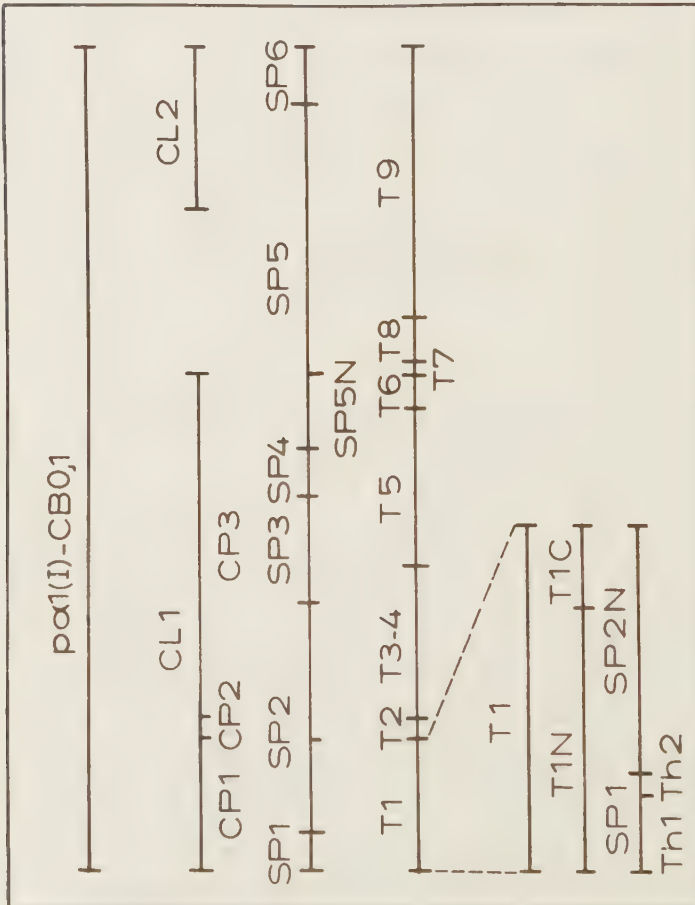


Abbildung 24: Zusammenfassende Darstellung aller aus den enzymatischen Spaltungen isolierter Peptide mit Angabe der Aminosäurezahl

Diese Peptide überlappen lückenlos die gesamte Sequenz des Prokollagenpeptids und ermöglichen so die Sequenzierung.

3. Sequenzierung des Prokollagenpeptides

3.1. Allgemeines zur Sequenzierungstechnik

Die Sequenzanalyse der Peptide wurde teilweise in einem Beckman-"liquid-phase"-Sequencer und teilweise in einem "solid-phase"-Sequencer durchgeführt. Der Beckman-Sequencer wurde für alle Peptide eingesetzt. Für die tryptischen Peptide T3-4 und T5 wurde zusätzlich der "solid-phase"-Sequencer verwendet. Bei diesen beiden Peptiden kam es darauf an, die Sequenz möglichst bis zum Ende zu bestimmen, damit eine sichere Überlappung mit den Peptiden aus der SP-Spaltung gegeben war.

Im "liquid-phase"-Sequencer werden alle Reaktionen an der Wand eines rotierenden Bechers durchgeführt. Die Proteine und Peptide werden als getrockneter Film gleichmäßig dünn an der Wand verteilt. Alle Reagentien und Lösungsmittel werden unten in den Becher eingegeben, verteilen sich an der Wand und werden oben wieder entfernt. Diese Anordnung hat hauptsächlich zwei Vorteile. Einmal ist durch die Verteilung der Peptide an der Becherwand eine große Reaktionsfläche gegeben und zum anderen kann durch die Rotationsgeschwindigkeit des Bechers sehr genau die Zeit bestimmt werden, die ein Reagenz oder Lösungsmittel im Becher verbleiben soll. Der gesamte Reaktionsablauf wird elektronisch gesteuert, so daß er vielfach in immer derselben Weise ablaufen kann (58,59). Große Proteine werden in einem relativ schwer flüchtigen Puffer - Quadrol - sequenziert. Kleinere Peptide werden

in Dimethylallylamin (DMAA) sequenziert, weil sie in organischen Lösungsmitteln besser löslich sind. DMAA ist wesentlich flüchtiger als Quadrol, so daß die Entfernung aus dem Reaktionssystem leichter ist. Dadurch kann die Zeit zum Entfernen des Puffers erheblich verkürzt werden, was die Gefahr, kleine Peptide zusammen mit dem Lösungsmittel auszuwaschen, verringert. Abgesehen davon, daß generell ein Peptid mit abnehmender Größe besser in organischen Lösungsmitteln löslich wird, hängt die Löslichkeit auch vom Gehalt und der Verteilung polarer Aminosäuren ab. Argininhaltige Peptide sind zum Beispiel schlecht löslich, so daß auch kleine Peptide häufig vollständig sequenziert werden können.

Neben der "liquid-phase"-Sequenzierung hat in den letzten Jahren eine Technik außerordentlich an Bedeutung gewonnen, bei der das Peptid an einen festen Träger gekuppelt wird - das "solid-phase"-Sequenzieren (60). Bei dieser Methode gibt es keine Löslichkeitsprobleme, weil das Peptid immobilisiert ist. Der limitierende Faktor ist hier die Effektivität der Kupplungsreaktion zwischen Peptid und Träger. Da bisher große Peptide nur mit sehr schlechtem Erfolg gekuppelt werden können, eignet sich das Verfahren vorwiegend für Peptide bis zur Größenordnung von etwa 100 Aminosäuren.

Alle Reaktionen finden in einer Glassäule, die mit dem Peptid-Trägermaterial gefüllt ist, statt. Überschüsse an Reagentien und Lösungsmitteln können durch einfaches Spülen der Säule vollständig entfernt werden. Als Trägermaterialien werden Polystyrole und Glas verwendet, die mit reaktiven

Gruppen versehen werden, an die dann das Peptid gebunden werden kann (61). Besonders günstig für derartige Kuppelungen sind Peptide, die Homoserin, Lysin, Aminoäthylcystein oder Ornithin (entsteht durch Abspaltung von Harnstoff aus Arginin) enthalten. Solche Peptide können mit Ausbeuten von häufig über 90% gekuppelt werden. Man entwickelt aber auch bereits Methoden, um fast jedes Peptid kuppeln zu können, damit auch diese Art der Sequenzierung universell anwendbar wird.

Für die Identifizierung der abgespaltenen Aminosäuren wurden folgende Systeme eingesetzt (62):

1. Dünnschichtchromatographie
2. Gaschromatographie
3. Rückhydrolyse zur freien Aminosäure und Nachweis am Aminosäureanalysator
4. Massenspektrometrie

Dabei wurden fast alle Aminosäuren in zwei dieser Systeme identifiziert. Für die einzelnen Läufe am Sequenator wurden zwischen 100 und 500 nMol Peptid eingesetzt.

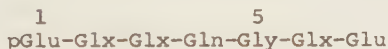
3.2. Ergebnisse der Sequenzierung der einzelnen Fragmente des Prokollagenpeptides

Die Sequenzierung wird in der Reihenfolge vom N- zum C-Terminus beschrieben. Tabelle 8 zeigt die verwendeten Peptide, das jeweilige Sequenzprogramm und die Anzahl der identifizierten Positionen:

Peptid	Länge	Programm/ Sequencer	Anzahl der ident. Positionen	nMol eingesetztes Peptid
SP2N	17	DMAA / LP	13	200
SP2	46	DMAA / LP	23	300
T2	4	DMAA / LP	4	?
CP3	69	DMAA / LP	16	300
T3-4	34	DMAA / LP	16	250
		SP	16	300
SP3	20	DMAA / LP	13	250
T5	29	DMAA / LP	19	300
		SP	29	400
SP4	9	DMAA / LP	7	?
SP5N	14	DMAA / LP	14	200
T6	6	DMAA / LP	6	?
SP5	63	DMAA / LP	36	300
T7	3	DMAA / LP	3	?
T8	8	DMAA / LP	8	?
T9	49	DMAA / LP	32	300
CL2	30	DMAA / LP	18	300

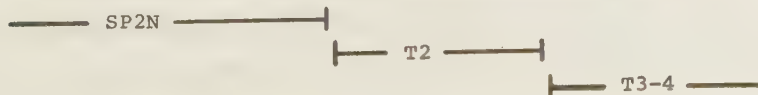
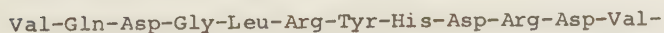
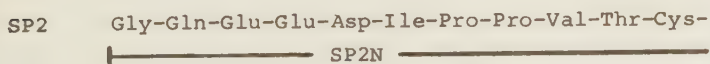
Tabelle 8: Spezielle Angaben zur Sequenzierung der Peptide aus den verschiedenen Spaltungen von pal(I)-CB 0,1-CL1 und pal(I)-CB 0,1
 LP = "liquid phase"-Sequencer
 SP = "solid phase"-Sequencer
 DMAA = Dimethylallylamin

Die Sequenz der N-terminalen 7 Aminosäuren mußte, weil der N-Terminus durch eine Pyrroglutaminsäure blockiert ist, erschlossen werden. Dies gelang durch die Isolierung kleinster Fragmente aus dem Bereich von SP1 (siehe Seite 56). Die so bestimmte Sequenz lautet:



Von den 6 Glutaminen, bzw. Glutaminsäuren, sind außer der pGlu noch das Gln auf Position 4 - wäre es ein Glu, sollte die Staphylokokkenprotease gespalten haben - und das Glu auf Position 7 - das SP-Enzym spaltet nur Glutaminsäure- und nicht Glutaminbindungen - festgelegt.

Auf SP1 folgt - siehe SP -Spaltung von p α l(I)-CB 0,1-T1 - direkt SP2. Von diesem 46 Aminosäuren langen Peptid konnten zunächst nur 13 Schritte bestimmt werden; auf 13 ist ein Glutamin, das unter den Bedingungen der Sequenzierung zur Ringbildung neigt. Dabei entsteht eine Pyrroglutaminsäure, die nicht sequenzierbar ist. Diese Schwierigkeit konnte erst durch den Einsatz größerer Mengen Peptid umgangen werden. Trotz des hohen Ausbeuteverlustes war es jetzt möglich, eine lückenlose Sequenz von 23 Schritten zu bestimmen.



Auf den Positionen 24 und 28 befindet sich je ein Arginin, die das Ende der tryptischen Peptide T1 und T2 darstellen. Damit ist durch die Sequenzierung von SP2 eine Überlappung von T1 nach T3-4 geschaffen. Gleichzeitig ist die Zuordnung der tryptischen Peptide gesichert. Bestätigt wurden die gefundenen Sequenzen durch die Analyse von SP2N (Position 8-20) und T2 (Position 25-28).

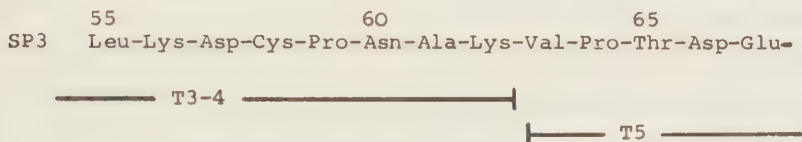
In Position 28 beginnen zwei Peptide T3-4 und CP3. Die Sequenzierung dieser Fragmente brachte eine gleichlautende Sequenz von 16 Aminosäuren:

	30	35
T3-4(CP3)	Asp-Val-Try-Lys-Pro-Val-Pro-Cys-Gln-Ile-Cys-	
	40	44
	Val-Cys-Asp-Asp-Asp-	

Obwohl CP3 mit 69 Resten doppelt so lang ist wie T3-4, konnte es nicht über Position 44 hinaus sequenziert werden. Das lag nicht daran, daß das Peptid etwa schnell ausgewaschen wurde, denn auch der Versuch, das Peptid T3-4 mit Hilfe der "solid-phase"-Technik zu analysieren, endete an dieser Stelle. Offenbar wird an dieser Position das Peptid durch eine Nebenreaktion völlig blockiert. Das könnte in Zusammenhang mit Zuckern stehen, die in geringen Mengen im Prokollagenpeptid vorkommen (Timpl, R. persönliche Mitteilung) und die vielleicht an Asparaginsäure gebunden sind. Weitere auffällige Merkmale des Sequenzabschnittes sind einmal das Tryptophan in Position 31 und zum anderen das daneben liegende Lysin, das wegen seiner Nachbarschaft mit

Prolin nicht mit Trypsin gespalten werden kann.

Nachdem durch die Schwierigkeiten bei der Sequenzierung von T3-4 nur 16 Schritte ermittelt werden konnten, blieb eine Sequenzlücke bis zu dem nach der Zuordnung nächst folgenden Peptid SP3. Von diesem 20-er Peptid wurden 13 Schritte bestimmt:

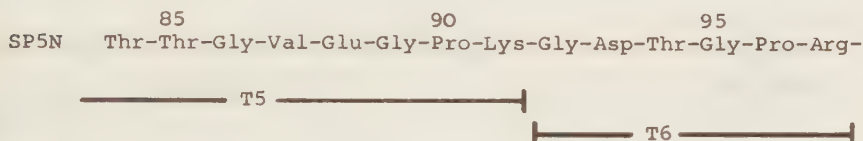


Die Lysine in den Positionen 56 und 62 markieren einmal die schlecht spaltbare Bindung zwischen T3 und T4 (56-57) und zum anderen die Überlappung von T3-4 nach T5 (62-63). Damit sind aus dem Bereich von T3-4 die ersten 16 und die letzten 8 Reste festgelegt. Die Lücke dazwischen hat eine Länge von 10 Aminosäuren. Die Aminosäuren in der Lücke ergeben sich durch Abziehen der sequenzierten Reste von der Gesamtzusammensetzung von T3-4 folgendermaßen:

Asx, Asx, Asx, Gly, Gly, Cys, Cys, Val, Leu und Glu

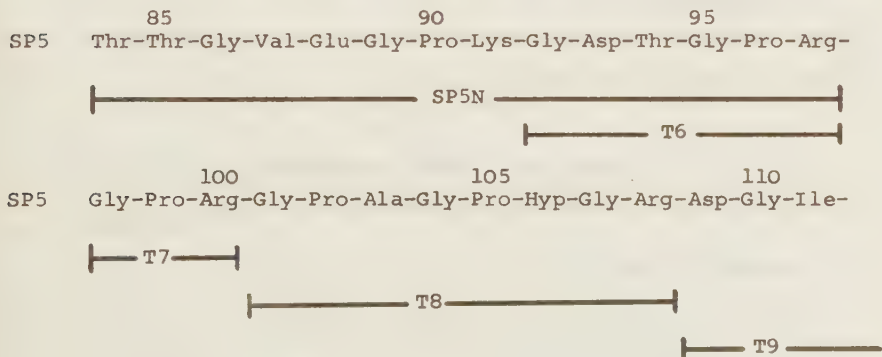
Die Glutaminsäure muß dabei die C-terminale Aminosäure dieses Bereiches darstellen, weil die Peptide aus einer SP-Spaltung stammen, bei der unter den gewählten Bedingungen nur Glutaminsäurebindungen gespalten werden. Die Sequenzanalyse des folgenden Peptides T5 brachte zu-

Damit ist SP5 (bzw. SP5N) um acht Schritte überlappt. Die Sequenzierung von SP4 bestätigte die Positionen 75-83, während SP5N - es konnte mit allen 14 Resten vollständig sequenziert werden - die Positionen 84-91 bestätigte und darüber hinaus die Überlappung zum C-terminalen tryptischen Peptid von $\alpha 1(I)$ -CB 0,1-CL 1 - T6 - brachte.



Auffällig an der C-terminalen Sequenz ist ab Position 86 der Übergang von der globulären Struktur in die kollagentypische Struktur mit den (Gly-X-Y)-Einheiten.

Die weitere Strukturaufklärung des tripelhelikalen Bereiches wurde durch das Peptid SP5 möglich, das wie SP5N anfängt und mit 63 Aminosäuren bis in den Beginn der $\alpha 1(I)$ -Kette hineinreicht. Von diesem Fragment wurden 36 Schritte bestimmt:



SP5 115
Hyp-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Hyp-Gly-

————— T9 —————

Diese Sequenz wurde durch die Analyse von T7 und T8, die damit auch endgültig zugeordnet waren, in den Positionen 98-100 und 101-108 bestätigt. Ab Position 109 wurde das 49 Aminosäuren lange Peptid T9 sequenziert und ergab die folgenden 32 Schritte:

T9 110 115 120
Asp-Gly-Ile-Hyp-Gly-Gln-Pro-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-

T9 125 130
Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Leu-Gly-Gly-

————— CL2 —————

T9 135 138 139
Asn-Phe-Ala-Pro-Gln-Leu

————— CL2 —————

Die letzten 13 Schritte von T9 überlappen mit CL2 und die letzten zwei mit dem N-Terminus der α(I)-Kette. Die Sequenzierung von CL2 brachte die Bestätigung dieses Bereiches, und damit auch der Spaltstelle für die Prokollagenpeptidase auf den Positionen 138-139.

CL2 130 135 140
Gly-Pro-Hyp-Gly-Leu-Gly-Gly-Asn-Phe-Ala-Pro-Gln-Leu-

α(I)-CB 0,1

 145
Ser-Tyr-Gly-Tyr-Asp-

————— α(I)-CB 0,1 —————

Damit ist die Sequenz des Prokollagenpeptides der $\alpha 1(I)$ -Kette bis auf die Positionen 45-52 vollständig aufgeklärt. Abbildung 25 zeigt noch einmal im Zusammenhang die für die Sequenzierung wesentlichen Peptide und ihre sequenzierten Bereiche.

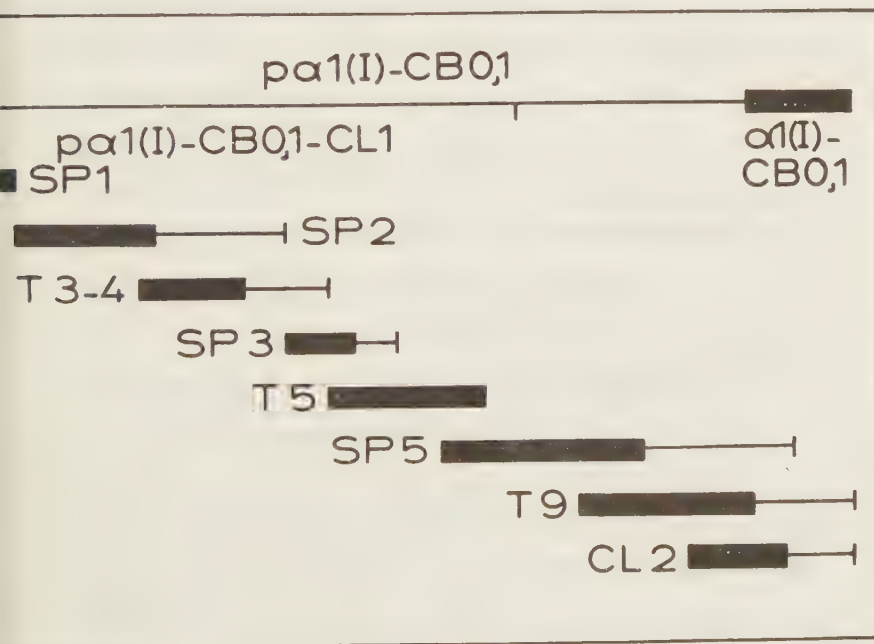
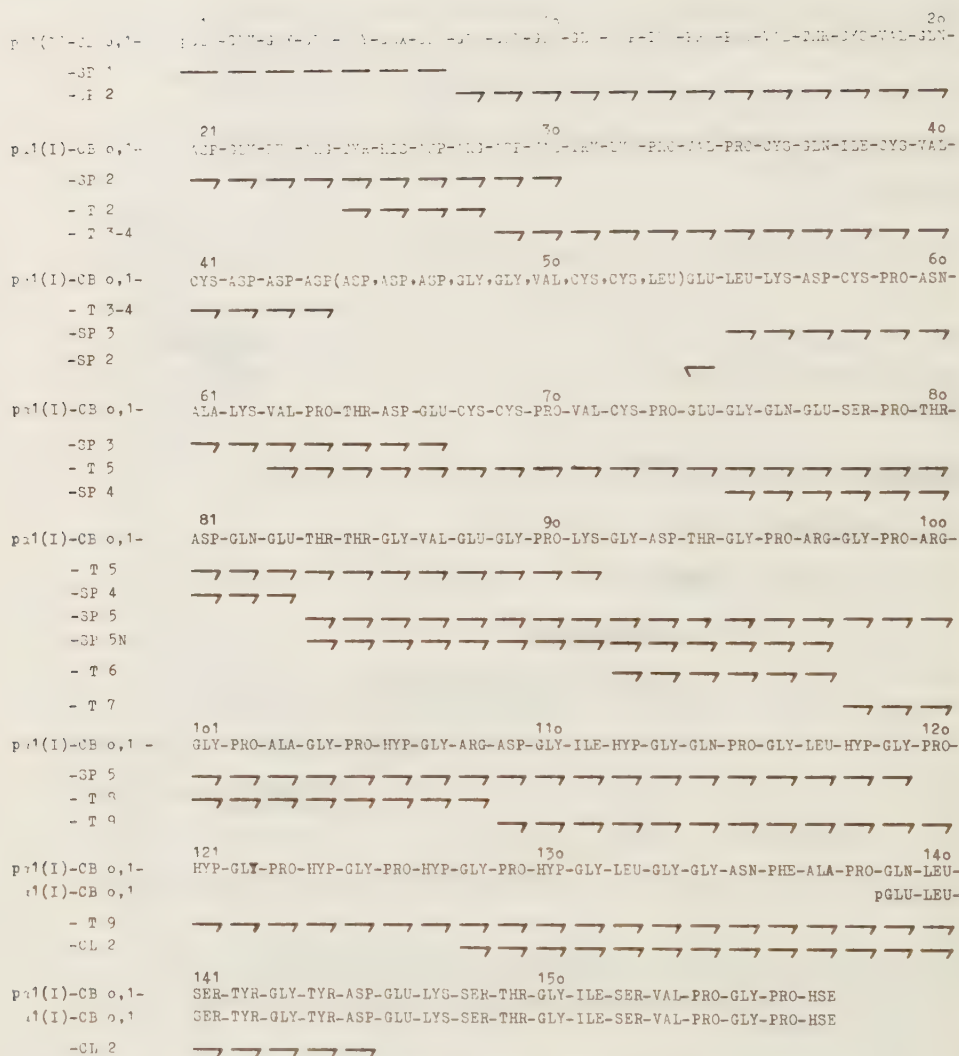


Abbildung 25: Zuordnung und sequenzierte Bereiche der für die Sequenzbestimmung wesentlichen Peptide

Fast jeder Sequenzabschnitt wurde durch die Analyse mehrerer Peptide aus verschiedenen Spaltungen bestätigt. Die vollständige Sequenz ist in Abbildung 26, Seite 80, mit Angabe der sequenzierten Positionen dargestellt.



DISKUSSION

Ausgangspunkt für die vorliegende Untersuchung zur Primärstruktur des Prokollagens waren Spekulationen über mögliche biologisch-regulatorische Eigenschaften der N- und C-terminalen Prokollagenpeptide. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang zum einen Funktionen bei der Ausbildung des tripelhelikalen Moleküls, seinem Transport durch die Zelle und seiner Sekretion in die extrazelluläre Matrix und zum anderen regulatorische Eigenschaften bei der Biosynthese der pro α -Ketten und bei der Bildung der Fibrillen, also der physiologisch aktiven Form des Kollagens.

Ziel der Arbeit war es, diesen Hypothesen eine experimentelle Grundlage zu geben. Notwendige Voraussetzung für das Verständnis der biologischen Funktion eines Proteins auf molekularer Ebene ist die Kenntnis seiner kovalenten Struktur, also der Aminosäuresequenz. Sie determiniert die höheren Strukturen des Moleküls und ist damit für die Funktion verantwortlich.

Prokollagen stellt im Verlaufe der Biosynthese und der post-ribosomalen Veränderungen des Kollagens ein Zwischenprodukt dar, das in normalen Geweben sehr schnell durch Abspaltung der Prokollagenpeptide zu Kollagen umgewandelt wird. Aus diesem Grunde war es bisher unmöglich, Prokollagen in größeren Mengen anzureichern und zu isolieren, um eine Primärstrukturanalyse durchführen zu können. Erst die Entdeckung

der Dermatosparaxie ermöglichte die Isolierung von Prokollagen in den benötigten Mengen.

In diesem Fall einer äußerst selten auftretenden erblichen Bindegewebserkrankung ist die Prokollagen-/Kollagenumwandlung durch den Ausfall eines Enzyms - der Prokollagenpeptidase - erheblich gestört, so daß es zur Anreicherung von Prokollagen im Gewebe kommt. Dieses Prokollagen besitzt noch das N-terminale Prokollagenpeptid, während das C-terminale Peptid normal abgespalten wird. Es stellt somit ein geeignetes Material für die Untersuchung der kovalenten Struktur des N-terminalen Peptides dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das N-terminale Prokollagenpeptid der $\alpha 1$ -Kette des Typ I - Prokollagens isoliert, charakterisiert und sequenziert.

Aufgrund vergleichender Untersuchungen von $\alpha 1(I)$ - und den $\alpha 1(I)$ -Ketten aus der dermatosparaxischen Haut standen für die Isolierung des Peptides grundsätzlich zwei Methoden zur Verfügung. Zum einen sollte die Spaltung mit Bromcyan das ganze Peptid liefern, weil es selbst kein Methionin enthält und zum anderen sollte auch mit bakterieller Kollagenase das vollständige Peptid erhalten werden, da es keine kollagenen Sequenzen zu enthalten schien. Die Isolierung des Bromcyanpeptides - $\alpha 1(I)$ -CB 0,1 - machte zunächst große Schwierigkeiten, weil es aufgrund seiner Struktur eine hohe Affinität zu Ionenaustauschern wie Carboxymethyl- oder Phosphocellulose besitzt. Deshalb wurde die Kollagenasespaltung

anfangs bevorzugt. Die Aufarbeitung der Kollagenasespaltungen ergab aber entgegen der Erwartung zwei Peptide - $\alpha 1(I)$ -CB O,1-CL 1 und $\alpha 1(I)$ -CB O,1-CL 2 -. Die Schlußfolgerung aus den Ergebnissen dieser Versuche war die Annahme, daß das Prokollagenpeptid kollagenaseempfindliche - also eine Tripelhelix induzierende - Sequenzen enthalten mußte. $\alpha 1(I)$ -CB O,1-CL 1 mit 97 Resten stellt den aminoterminalen Bereich dar, während $\alpha 1(I)$ -CB O,1-CL 2 die carboxyterminalen 11 Reste enthält und darüber hinaus die ersten 19 Reste der $\alpha 1(I)$ -Kette. Beide Peptide zeigten keine besondere Affinität zu Ionenaustauschern und konnten in hohen Ausbeuten isoliert werden. Die Länge des zwischen diesen beiden Peptiden gelegenen Bereichs blieb zunächst unbekannt. Zur Isolierung dieses Abschnitts wurde dann doch wieder auf die Bromcyanbehandlung zurückgegriffen, nachdem sich herausgestellt hatte, daß $\alpha 1(I)$ -CB O,1 in Puffern mit hohen Harnstoffkonzentrationen auch an Ionenaustauschern gut chromatographierbar ist. Das Peptid besteht aus 157 Resten, beinhaltet die beiden Kollagenasepeptide und außerdem 30 weitere Reste, die kollagenähnliche Struktur haben und deshalb von Kollagenase in kleine Fragmente zerlegt werden.

Für die Sequenzanalyse wurden sowohl $\alpha 1(I)$ -CB O,1 als auch $\alpha 1(I)$ -CB O,1-CL 1 nach Abbau von harnstoffunlöslichem Prokollagen isoliert. Die dabei infolge des relativ hohen Anteils an nicht-kollagenem Material in den Abbauteilen auftretenden Trennprobleme konnten unter Ausnutzung der sehr sauren

Eigenschaften des Peptides durch Chromatographie an DEAE-Cellulose gelöst werden; es gelang eine Anreicherung um etwa 80% in diesem System.

Für die zur Sequenzbestimmung nötige Fragmentierung des Prokollagenpeptides wurden eine Reihe von chemischen und enzymatischen Spaltmethoden eingesetzt. Dabei erwiesen sich Spaltungen mit Clostripain und Trypsin an basischen Aminosäuren sowie mit der Staphylokokkenprotease an sauren Aminosäuren als am besten geeignet. Die isolierten Peptide konnten aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung eindeutig zugeordnet werden.

Die Sequenzierung der einzelnen Fragmente wurde hauptsächlich durch zwei Gegebenheiten erheblich erschwert. Einmal konnte das Gesamtpeptid nicht ansequenziert werden, weil es durch eine Pyrroglutaminsäure blockiert ist und zum anderen führte der hohe Gehalt der Peptide an Glutamin bzw. Glutaminsäure und Asparagin bzw. Asparaginsäure immer wieder zu hohen Ausbeuteverlusten im Sequenator. Hinzu kommt, daß einzelne Peptide (z.B. T3-4) immer nur in schlechten Ausbeuten isoliert werden konnten. Diese Hindernisse führten dazu, daß zwangsläufig die Sequenz der aminoterminalen 7 Reste nicht durch Edman-Abbau im Sequenator bestimmt werden konnte, sondern durch die Aminosäureanalyse kleinster Fragmente aus diesem Bereich erschlossen werden mußte. Außerdem konnte ein kurzer Bereich im Peptid T3-4 (Positionen 45-53) nicht bestimmt werden, weil eine automatische Sequenzierung von

T3-4 über die Position 44 hinaus weder mit der "liquid-phase"- noch mit der "solid-phase"-Methode möglich war. Die Ausbeuten in den Schritten 42-44 (Asp-Asp-Asp) gingen immer auf null herunter und zwar unabhängig von der Menge Peptid, die eingesetzt wurde. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, daß an den Asparaginsäuren Kohlehydrate gebunden sind, die in geringer Menge im Prokollagenpeptid vorkommen (R. Timpl, pers. Mitteilung). Dies führt erfahrungsgemäß zu Ausbeuteverlusten in der Sequenzierung. In allen anderen Fällen konnte das Problem des Materialverlustes durch den Einsatz größerer Mengen Peptid gelöst werden.

Entlang der Sequenz von $\alpha 1(I)$ -CB 0,1 lassen sich drei strukturell und funktionell voneinander verschiedene Bereiche unterscheiden. Der N-terminale Abschnitt (Positionen 1-85) hat nicht-kollagene Struktur. Sie ist durch den außerordentlich hohen Gehalt an Glutamin und Asparagin sowie Glutaminsäure und Asparaginsäure gekennzeichnet (zusammen 30%). Außerdem enthält dieser Bereich fünf Disulfidbrücken, die ihm eine sehr kompakte Struktur geben. Nach physikalischen Messungen an $\alpha 1(I)$ -CB 0,1-CL 1 - es enthält den Bereich vollständig - hat das Peptid einen Durchmesser von 15 Å bei einer Gesamtlänge von etwa 100 Å und stellt sich damit als langgestrecktes Stäbchen dar (62).

Auf den N-terminalen Abschnitt folgt eine Sequenz von 51 Aminosäuren (Positionen 86-136), die sich in 17 (Gly-X-Y)-

Einheiten untergliedert. Sie enthält kein Cystein, aber sehr viel Prolin und Hydroxyprolin (33%). Infolge des hohen Gehaltes an Iminosäuren (Kollagen enthält im Durchschnitt nur etwa 25% Iminosäuren) induzieren die 17 Tripletts eine besonders stabile Tripelhelix, die erst bei einer deutlich höheren Temperatur denaturiert, als die Kollagentripelhelix (P. Bruckner pers. Mitteilung).

Der C-terminale Bereich von $\alpha 1(I)$ -CB 0,1 enthält 21 Aminosäuren, von denen die ersten zwei noch dem Prokollagenpeptid angehören, während die restlichen 19 den N-Terminus der $\alpha 1(I)$ -Kette darstellen. Dieser Abschnitt ist durch zwei wesentliche Merkmale charakterisiert. Zum einen trägt er die funktionelle Gruppe für die Quervernetzung des Kollagens (siehe S. 2) und zum anderen enthält er die Spaltstelle für die Prokollagenpeptidase, die in der Dermatosparaxie ausfällt. Für beide funktionellen Gruppen dürfte es von Bedeutung sein, daß der Bereich nicht-kollagene Sequenzen aufweist, also keine starre Struktur besitzt. Die Spaltstelle für die Prokollagenpeptidase lautet Pro - Gln. Prolinspezifische Endopeptidasen sind bisher noch nicht beschrieben worden. Auch Untersuchungen über die Prokollagenpeptidase gibt es nur wenige (33,34,35). Sie läßt sich relativ schwer rein darstellen. Die Spezifität des Enzyms ist außerordentlich hoch, denn Pro - Gln-Bindungen im helikalen Teil des Kollagens werden ebensowenig gespalten wie in anderen Proteinen. Über den Spaltungsmechanismus kann man nur sagen, daß tripelhelikale native Prokollagenmoleküle sehr

viel schneller umgewandelt werden als einzelne α -Ketten. Inwieweit die Umwandlung des nach der Abspaltung des Prokollagenpeptides N-terminalen Glutamins zu Pyrroglutaminsäure ebenfalls von der Peptidase durchgeführt wird oder ein anders gesteuerter Prozeß ist, ist bisher unklar. Es wäre denkbar, daß die Hydrolyse der Peptidbindung und die Ringbildung in einem Schritt erfolgen.

Eine Zuordnung von bestimmten biologischen Funktionen zu den durch die Sequenzanalyse aufgeklärten Strukturen ist in begrenztem Umfang bereits möglich. Als eine der wesentlichen Funktionen der N- und C-terminalen Prokollagenpeptide wird die Verhinderung intrazellulärer Fibrillenbildung diskutiert. Einleitender Schritt für die Fibrillenbildung ist die Abspaltung der Prokollagenpeptide. Elektronenoptische Aufnahmen von dermatosparaxischer Haut zeigen deutlich, daß schon die Nichtabspaltung des N-terminalen Peptides genügt, um die Bildung einer geordneten Fibrillenstruktur wirksam zu verhindern (siehe Abb. 4, S. 11, (44)). Läßt man auf Gewebestücke aus dermatosparaxischer Haut unter geeigneten Bedingungen Chymotrypsin einwirken, so spaltet das Enzym die nichthelikalen Bereiche des Prokollagens ab, während die Tripelhelix unangetastet bleibt. Damit spaltet das Enzym auch das Prokollagenpeptid ab und simuliert auf diese Weise die Wirkung der Prokollagenpeptidase. Den Effekt einer solchen Abspaltung kann man im Elektronenmikroskop sichtbar machen (Abbildung 27, S. 88). Schon nach 24-stündiger Einwirkung von Chymotrypsin wird eine

FIBRILLENBILDUNG

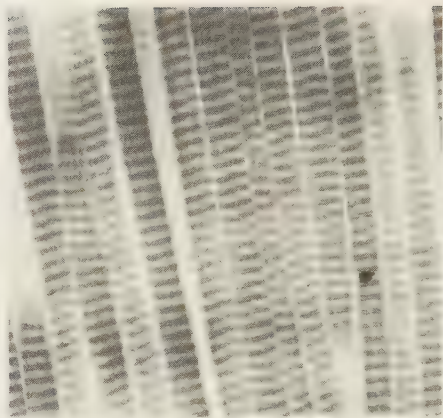
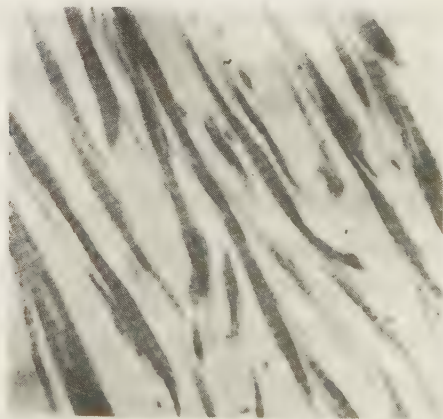
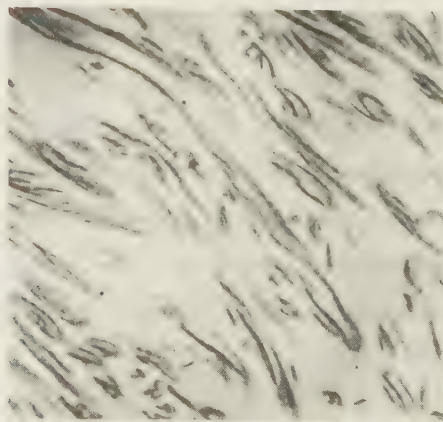
in

dermatoparaxischer

und

normaler

Kalbshaut



VOR Inkubation mit

NACH Inkubation mit

CHYMOTRYPSIN

Vergrößerung 50000-fach

Anfärbung mit Phosphorwolframsäure, Uranylacetat

Abbildung 27: Fibrillenbildung in dermatoparaxischer Haut unter Einfluß von Chymotrypsin

deutlich vermehrte Bildung normaler Fibrillen beobachtet, die offenbar durch den Wegfall einer sterischen Behinderung durch das Prokollagenpeptid ermöglicht wird. Inwieweit das C-terminale Peptid die Fibrillenbildung beeinflusst, kann nicht gesagt werden, weil bisher kein entsprechendes Modell untersucht werden konnte. Auch für die theoretische Möglichkeit einer Regulation der Fibrillendicke durch den gezielten Einbau von mehr oder weniger Prokollagen in die Fibrille gibt es keine experimentellen Hinweise.

Für eine weitere der postulierten Funktionen des Prokollagenpeptides - seine Rolle als Regulationsfaktor der Kollagenbiosynthese allgemein - gibt es dagegen bereits gute Hinweise (Hörlein, Wiestner, Glanville und Müller, in Vorbereitung). Bisher wurde über diesen Aspekt aufgrund von Ergebnissen aus Experimenten mit dem Ehlers-Danlos Syndrom Typ VII diskutiert (38). In Hautfibroblastenkulturen von Patienten mit dieser Erkrankung - sie zeichnet sich wie die Dermatosparaxie durch eine sehr geringe Aktivität der Prokollagenpeptidase aus - wurde eine stark erhöhte Kollagenbiosynthese gegenüber Normalfibroblastenkulturen gefunden. Dieses Ergebnis wurde als Regulationsdefekt, der möglicherweise mit der Nichtumwandlung von Prokollagen zu tun hat, gedeutet. Ein weiterer Hinweis auf eine biologische Funktion des Prokollagenpeptides war die Feststellung, daß das Peptid sehr lange in Amnionflüssigkeit und im Serum persistiert ohne abgebaut zu werden (39). Diese Stabilität gegenüber Proteasen erklärt sich aus der besonders kompakten

Struktur. Durch die Isolierung des Prokollagenpeptides und seiner Strukturaufklärung ergab sich die Möglichkeit, genauere Untersuchungen zu der Frage der Regulation durchzuführen. Als erste Ergebnisse dieser Experimente konnte festgestellt werden, daß

1. $\alpha 1(I)$ -CB O,1 spezifisch die Synthese von Typ I und Typ III-Kollagen hemmen kann, während die allgemeine Proteinbiosynthese unbeeinflusst bleibt,
2. das synthetisierte Kollagen den normalen Veränderungen unterliegt,
3. die Regulation der Typ I und Typ III Synthese nach einem einheitlichen Prinzip verläuft, weil das dem $\alpha 1(I)$ -CB O,1 entsprechende Peptid aus Typ III-Kollagen dieselbe Hemmung hervorruft wie $\alpha 1(I)$ -CB O,1,
4. die Synthese von Knorpelkollagen (Typ II) nicht zu beeinflussen ist, also eine Typenspezifität in Bezug auf die Hautkollagene (Typ I und III) besteht,
5. die Hemmeffekte mit den Peptiden aus Kalbshaut auch an Humanfibroblastenkulturen gemessen werden konnten, also keine Speziespezifität zu bestehen scheint, und
6. $\alpha 1(I)$ -CB O,1-CL 1 genauso gut hemmt wie $\alpha 1(I)$ -CB O,1.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß dem Prokollagenpeptid eine wesentliche und sehr spezifische Rolle in der Regulation der Kollagenbiosynthese zukommt. Die Tatsache, daß das Kollagenasepeptid genauso effektiv ist wie das Bromcyanpeptid

zeigt, daß der disulfidquervernetzte, aminoterminal Bereich des Prokollagenpeptides die regulatorische Aktivität trägt und nicht der tripelhelikale Abschnitt. Die Kenntnis der kovalenten Struktur des Prokollagenpeptides schafft nun die Möglichkeit, durch gezielte Fragmentierung oder chemische Veränderung des Prokollagenpeptides den für die Regulation wesentlichen Bereich weiter einzukreisen, um so auch Aussagen über den Mechanismus der Regulation machen zu können.

Über die weiteren Funktionen des Prokollagenpeptides im Zusammenhang mit der Tripelhelixbildung in der Zelle gibt es bisher keine experimentellen Beweise. Aus den Ergebnissen der Sequenzanalyse des Prokollagenpeptides läßt sich nur sagen, daß vielleicht die besonders stabile Helix im Peptid etwas mit der Registrierung der pro α -Ketten und der Ausbildung des tripelhelikalen Moleküls zu tun haben kann. Völlig außer acht gelassen werden mußte bisher auch die Rolle des C-terminalen Prokollagenpeptides mit seinen Disulfidbrücken zwischen den Ketten, weil es kein Modell gab, an dem entsprechende Untersuchungen vorgenommen werden konnten. Erst in jüngster Zeit ist es gelungen, Methoden zu entwickeln, die die Isolierung des Peptides in genügenden Mengen erlauben (63). Die Kenntnis der kovalenten Struktur und physikalischen Eigenschaften beider Peptide wird die Frage nach ihrer Funktion in Kettenauswahl und Tripelhelixbildung möglicherweise beantworten können.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden die ersten Sequenzuntersuchungen an Typ I Prokollagen beschrieben.

1. Aus dermatosparaxischen Kalbshäuten wurde eine Prokollagenform isoliert und charakterisiert, die sich durch zusätzliche Sequenzabschnitte am N-Terminus des Moleküls auszeichnet.

2. Diese zusätzlichen Sequenzabschnitte (Prokollagenpeptide) wurden aus HLK und ULK sowohl nach Bromcyan- als auch nach Abbau mit bakterieller Kollagenase durch Chromatographie isoliert.

3. Das Prokollagenpeptid der $\alpha_1(I)$ -Kette wurde durch Spaltung mit Clostripain, Trypsin, Thermolysin und der Staphylokokken-Protease fragmentiert. Die entstandenen, überlappenden Peptide wurden durch Ionenaustauscher- und Molekularsiebchromatographie gereinigt und durch Molekulargewichtsbestimmung und Aminosäureanalyse charakterisiert.

4. Die Sequenzanalyse der einzelnen Peptide wurde teils in einem Beckman-"liquid-phase"-Sequenator und teils in einem "solid-phase"-Sequenator durchgeführt. Es gelang auf diese Weise, fast die vollständige Sequenz des Prokollagenpeptides aufzuklären.

5. Das Prokollagenpeptid der α_1 -Kette von Typ I Prokollagen besteht aus 138 Aminosäuren und gliedert sich in drei struk-

turell und funktionell voneinander verschiedene Bereiche:

Der aminoterminaler Abschnitt besteht aus 85 Resten mit globulärer Struktur und enthält 5 Disulfidbrücken, die ihm eine besonders kompakte Form geben. Er scheint wesentlich an der Regulation der Kollagenbiosynthese beteiligt zu sein (feed-back - Mechanismus). Der zentrale Bereich des Peptides besteht aus 51 Aminosäuren mit typisch kollagener Struktur (17 (Gly-X-Y)-Einheiten). Eine Beteiligung dieses Bereiches an der Bildung des tripelhelikalen Prokollagenmoleküls erscheint möglich. Der C-terminale Bereich ist wieder nichthelikal und besteht aus zwei Aminosäuren. Daran schließt sich die Spaltstelle der Prokollagenpeptidase an, die mit der Sequenz Pro-GLN bestimmt werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung stellen insgesamt einen Beitrag zum Verständnis der biologisch-regulativen Funktion der Prokollagenpeptide dar. Die Kenntnis der kovalenten Struktur liefert darüber hinaus weitere Ansätze, die biologisch aktiven Strukturen auf dem Prokollagenpeptid einzugrenzen und zu charakterisieren. Von der Aufklärung der regulativen Funktion der Prokollagenpeptide können außerdem Auswirkungen auf Untersuchungen im Rahmen der Bindegewebspathologie erwartet werden.

LITERATURANGABEN

1. Traub W., Piez K.A. (1971)
The Chemistry and Structure of Collagen (Rev.) Adv.
Prot.Chem. 25,273ff.
2. Ramachandran G.N., Kartha G. (1955)
Structure of Collagen
Nature 176,593ff.
3. Rich A., Crick F.H.C. (1955)
Structure of Collagen
Nature 176,915ff.
4. Sakakibara S. et al. (1973)
Synthesis of (Pro-Hyp-Gly)_n of defined molecular
weights. Evidence for the Stabilisation of Collagen
Triple Helix by Hydroxyproline
Biochim.Biophys.Acta 303,198-202.
5. Salem G., Traub W. (1975)
Conformational Implications of Amino-Acid Sequence
Regularities in Collagen
Febs Letters 51,94-99.
6. Fietzek P.P., Kühn K. (1975)
Information Contained in the Amino-Acid Sequence of the
 α 1(I)-Chain of Collagen and its Consequences upon the
Formation of the Triple Helix, of Fibrils and Crosslinks
Mol.and Cell.Biochemistry 8,314ff.
7. Fietzek P.P., Kühn K. (1975)
The Primary Structure of Collagen
Int.Rev.Conn.Tissue Res. 7,1ff.
8. Miller E.J. (1973)
A Review of Biochemical Studies on the Genetically
Distinct Collagens of the Skeletal System
Clin.Orthop.Related Res. 92,260-280

9. Chung E., Miller E.J. (1974)
Collagen Polymorphism: Characterisation of Molecules
with the Chain Composition $\alpha 1(\text{III})_3$ in Human Tissues
Science 183,1200-1202.
10. Kefalides N.A. (1973)
Structure and Biosynthesis of Basement Membranes
Int. Rev.Conn.Tissue Res. 6,63-107.
11. Fietzek P.P., Rauterberg J. (1975)
Cyanogen Bromide Peptides of Type III Collagen.
First Sequence Analysis Demonstrates Homology with
Type I Collagen
Febs Letters 49,365-368.
12. Rauterberg J., Allmann H., Henkel W., Fietzek P.P. (1976)
Isolation and Characterisation of CNBr Derived Peptides
of the $\alpha 1(\text{III})$ Chain of Pepsin-solubilized Calf Skin
Collagen
Hoppe Seyler's Z.Physiolog.Chem. 357,1401-1407.
13. Wiedemann H., Chung E., Fujii T., Miller E.J., Kühn K.
(1975)
Comparative Electron-Microscope Studies on Type III
and Type I Collagens
Eur.J.Biochem. 51,363-368.
14. Glanville R.W., Fietzek P.P. (1976)
Amino Acid Sequence of the N-terminal Non-Triple
Helical Crosslink Region of Type III Collagen
Febs Letters 71, 1, 99-102.
15. Fietzek P.P., Allmann H., Rauterberg J., Wachter E. (1976)
The Amino Acid Sequence of the N-terminal Region of Pepsin
Solubilized Type III Collagen from Bovine Skin
Eur.J.Biochem. in Druck.
16. Glanville R.W., Allmann H., Fietzek P.P. (1976)
Cysteine Residues Mark the C-terminal Triple-Helical
Non Triple-Helical Junction in Type III Collagen
Hoppe Seyler's Z.Physiolog.Chem. 357,1663-1665.

17. Burgeson R.E., El Aldi F.A., Kaitila I.I.,
Hollister D.W. (1976)
Fetal Membrane Collagens: Identification of Two New
Collagen Alpha Chains
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 73,8, 2579-2583.
18. Kefalides N.A. (1975)
Basement Membranes: Structural and Biosynthetic
Considerations
J.Invest.Dermatology 65,85-92.
19. Gay S., Balleisen L., Remberger K., Fietzek P.P. (1975)
Adelmann B.C., Kühn K.
Immunohistochemical Evidence for the Presence of
Collagen Type III in Human Arterial Walls, Arterial
Thrombi and in Leukocytes Incubated with Collagen in
Vitro
Klin.Wochenschrift 53,899-902.
20. Wick G., Nowack H., Hahn E., Timpl R., Miller E.J. (1976)
Visualisation of Type I and II Collagens in Tissue
Sections by Immunohistologic Techniques
J.Immunol. 117,298-303.
21. Bornstein P. (1974)
The Biosynthesis of Collagen
Annual Rev.Biochem. 43,567-603.
22. Martin G.R., Byers P.H., Piez K.A. (1975)
Procollagen
Advanc.Enzymology 42,167-191.
23. Prockop D.J., Berg R.A., Kivirikko K.J., Uitto J. (1976)
Intracellular Steps in the Biosynthesis of Collagen
in: Biochemistry of Collagen
Ramachandran G.N., Reddi A.H. (Eds.)
Plenum Press New York and London
24. Lenears A., Lapière C.M. (1971)
Collagen Made of Extended α Chains, Procollagen, in
Genetically Defective Dermatosparactic Calves
Eur.J.Biochem. 23,533ff.

25. Fessler L.I., Morris N.P., Fessler J.H. (1975)
Procollagen.Biological Scission of Amino and Carboxyl
Extension Peptides
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 72,4905-4909.
26. Byers P.H., Click E.M., Harper E., Bornstein P. (1975)
Interchain Disulfide Bonds in Procollagen are Located
in a Large Nontriple-helical COOH-terminal Domain
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 72,3009-3013.
27. Gallop P.M., Pez M.A. (1975)
Posttranslational Protein Modification, with Special
Attention to Collagen and Elastin
Phys.Rev. 55,418-487.
28. Uitto J., Prockop D.J. (1973)
Rate of Helix Formation by Intracellular Procollagen
and Protocollagen. Evidence for a Role for Disulfide
Bonds
Biochem.Biophys.Res.Comm. 55,904-911.
29. Gay S., Martin G.R., Müller P.K., Timpl R., Kühn K.
(1976)
Simultaneous Synthesis of Type I and III Collagen by
Fibroblasts in Culture
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 73 in Druck
30. Müller P.K., Meigel W.N., Pontz B.F., Raisch K. (1974)
Influence of $\alpha\alpha'$ -Dipyridyl on the Biosynthesis of
Collagen in Organ Cultures
Hoppe Seyler's Z.Physiolog.Chem. 355,985-996.
31. Berg R.A., Prockop D.J. (1973)
Purification of ^{14}C Protocollagen and its Hydroxy-
lation by Prolyl-Hydroxylase
Biochemistry 12,3395-3401.
32. Morgan P.H., Jacobs H.G., Segrest J.P., Cunningham L.W.
(1970)
A Comparative Study of Glycopeptides Derived from
Skeletal Vertebrate Collagens: A Possible Role of the
Carbohydrate in Fibril Formation
J.Biol.Chem. 245,5042-5048.

33. Lapière C.M., Lenears A., Kohn L.D. (1971)
Procollagen Peptidase: An Enzyme Existing the Coordi-
nation Peptides of Procollagen
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 68,3054-3058.
34. Lapière C.M., Pierard G. (1974)
Skin Procollagen Peptidase in Normal and Pathologic
Conditions
J.Invest.Dermatology 62,582-586.
35. Zupnik J., Lenears A., Lee G., Lapière C.M., Kohn L.D.,
Isersky C. (1974)
Calf Tendon Procollagen Peptidase: Its Purification
and Endopeptidase Mode of Action
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 71,40-44.
36. Davidson J.M., Mc Eneany L.S.G., Bornstein P. (1975)
Intermediates in the limited Proteolytic Conversion of
Procollagen to Collagen
Biochemistry 14,5188-5194.
37. Fjølstad M., Helle O. (1974)
A Hereditary Dysplasia of Collagen Tissues in Sheep
J. Path. 112,183-188.
38. Lichtenstein J.R., Martin G.R., Kohn L.D., Byers P.H.,
Mc Kusick V.A. (1973)
A Defect in the Conversion of Procollagen to Collagen
in a Form of Ehlers Danlos Syndrome
Science 182,298-300.
39. Nowack H., Rohde H., Timpl R. (1976)
Isolation of a Procollagen Peptide from Amniotic Fluid
Hoppe Seyler's Z.Physiolog.Chem. 357,601-604.
40. Meigel W.N., Müller P.K. (1975)
Kollagenkrankheiten
Med.Klin. 70,1255-1264.
41. Uitto J., Lichtenstein J.R. (1976)
Defects in Biochemistry of Collagen in Diseases of
Connective Tissue
J.Invest.Dermatology 66,59-79.

42. Hanset R. (1971)
Dermatosparaxis of the Calf, a Genetic Defect of the
Connective Tissue
Hoppe Seyler's Z.Physiolog.Chem. 352,13.
43. Stark M., Lenears A., Lapière C.M., Kühn K. (1972)
Electronmicroscopical Studies of Procollagen from the
Skin of Dermatosparactic Calves
Febs Letters 18,225-227.
44. Shoshan S., Segel N., Traub W., Salem G., Kühn K. (1974)
Normal Characteristics of Dermatosparactic Calf Skin
Collagen following their Subcutaneous Implantation
within a Diffusion Chamber into a Normal Calf
Febs Letters 41,269-274.
45. Bailey A.J., Lapière C.M. (1973)
Effect of an Additional Extension of the N-terminus of
Collagen from Dermatosparactic Calves on the Cross-
linking of the Collagen Fibres
Eur.J.Biochem. 34,91-96.
46. Furthmayr H., Timpl R., Stark M., Lapière C.M.,
Kühn K. (1972)
Chemical Properties of the Peptide Extension in the
 $\alpha 1(I)$ Chain of Dermatosparactic Skin Procollagen
Febs Letters 28,247-250.
47. Hörlein D. (1976)
Isolierung und Charakterisierung von Prokollagen aus
dermatosparaxischer Kalbshaut
Diplomarbeit, Universität München, Fachbereich Biologie
48. Rauterberg J., Timpl R., Furthmayr H. (1972)
Structural Characterisation of N-terminal Antigenic
Determinants in Calf and Human Collagen
Eur.J.Biochem. 27,231-237.
49. Rauterberg J., Kühn K. (1971)
Acid Soluble Calf Skin Collagen. Characterisation of
the Peptides Obtained by Cyanogen Bromide Cleavage of
its $\alpha 1$ -Chain
Eur.J.Biochem. 19,398-407.

50. Witkop B. (1968)
Chemical Cleavage of Proteins
Science 162,318-325.
51. Bornstein P., Balian G., Click Eva M. (1971)
Structure of Rat Skin Collagen $\alpha 1$ -CB 8. Amino Acid
Sequence of the Hydroxylamine-Produced Fragment HA 1
Biochemistry 10,4470-4478.
52. Mitchel W.M., Harvington W.F. (1970)
in: The Enzymes Band 3,699 ff. Hrsg. Boyer P.D.
Academic Press, New York-London
53. Houmard J., Drapeau G.R. (1972)
Staphylococcal Protease: A Proteolytic Enzyme
Specific for Glutamoyl Bonds
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69,3506-3509.
54. Tschesche H, Kupfer S. (1972)
C-terminal Sequence Determination by Carboxypeptidase C
from Orange Leaves
Eur.J. Biochem. 26,33-36.
55. Gollwitzer R., Becker U., Timpl R. (1974)
Isolation and Characterisation of Reduced and amino-
ethylated Polypeptide Chains of Bovine Fibrinogen
Febs Letters 47,177-180.
56. Furthmayr H., Timpl R. (1971)
Characterisation of Collagen Peptides by Sodium
Dodecylsulfate-Polyacrylamide Electrophoresis
Anal.Biochem. 41,510 ff.
57. Fietzek P.P., Kühn K. (1972)
Sequence Analysis of Proteins and Peptides
in: Topics in Current Chemistry 29
Automation in Analytical Chemistry
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
58. Edman P., Begg G. (1967)
A Protein Sequenator
Eur.J.Biochem. 1,80 ff.

59. Laursen R.A. (1970)
Solid-phase Edman Degradation
An Automatic Peptide Sequencer
Eur.J.Biochem. 20,98 ff.
60. Laursen R.A. (Herausgeber) (1976)
Solid-phase Methods in Protein Sequence Analysis
(Proceedings of the First International Conference)
Herausgegeben von Pierce Chemical Company, Rockford,
Ill. USA
61. Edman P.
Sequence Determination: D. Identification of Amino
Acids
in: Protein Sequence Determination (Needleman S.B.
Herausgeber) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York
62. Engel J., Bruckner P., Becker U., Timpl R.,
Rutschmann B. (1977)
Physical Properties of the Aminoterminal Precursor
Specific Portion of Type I Procollagen
Biochemistry, in Druck
63. Olsen B.R., Guzman N.A., Engel J., Condit C.,
Aase S. (1977)
Purification and Characterisation of a Peptide from
the Carboxy-Terminal Region of Chick Tendon Pro-
collagen Type I
Biochemistry, 16,3030-3036.

LEBENS LAUF

Hans Dietrich Hörlein

geboren am 25.5.1949 in Wuppertal

Eltern: Dr. med. Heinrich Hörlein

Ella Hörlein, geb. Westphal

Schulbildung:

1955-56 Volksschule Yorkstraße, Wuppertal-Vohwinkel

1956-59 Bayerschule, Leverkusen

1959-62 Carl Duisburg Gymnasium, Leverkusen

1962-68 Freiherr vom Stein Gymnasium, Leverkusen

Abschluß mit dem Abitur im Juli 1968

Studium:

ab WS 1968/69 Studium der Biologie an der LMU München

Vordiplom 1972

Hauptdiplom 1976

Seit Januar 1973 am MPI für Biochemie, Martinsried bei
München, Abt. Bindegewebsforschung (Leiter: Prof. Klaus Kühn)

1973-74 Diplomarbeit

"Isolierung und Charakterisierung von
Prokollagen aus dermatosparaxischer
Kalbshaut"

1974-1977 Doktorarbeit

